



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

**XX CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
INGEGNERIA E SCIENZA DEI MATERIALI**

**UN DISPOSITIVO MEMS PER LO STUDIO DELLE
PROPRIETÀ MECCANICHE DI SINGOLE
CELLULE**

Settore scientifico-disciplinare ING-IND/22

DOTTORANDA:
Francesca ANTONIOLLI

**COORDINATORE DEL COLLEGIO
DEI DOCENTI:**
Chiar.mo Prof. Sergio MERIANI
Università degli Studi di Trieste

RELATORE:
Chiar.mo Prof. Orfeo SBAIZERO
Università degli Studi di Trieste

CORRELATORE:
Ing. Nicola SCUOR
Università degli Studi di Trieste

Indice

Introduzione

1. La cellula e la biomeccanica cellulare.....	9
1.1 La cellula.....	9
1.1.1 La cellula: organuli e strutture costituenti.....	9
1.1.2 Adesione cellulare, spreading e locomozione	17
1.2 La biomeccanica cellulare	21
1.2.1 Modelli meccanici cellulari.....	22
1.2.2 La meccano-trasduzione.....	27
2. Tecniche per lo studio della meccanica cellulare.....	34
2.1 Tecniche per la deformazione locale di una singola cellula	35
2.1.1 Microscopio a Forza Atomica	35
2.1.2 Magnetic twisting cytometry.....	38
2.2 Tecniche per la deformazione di un'intera cellula	39
2.2.1 Aspirazione con micropipette.....	39
2.2.2 Optical tweezers	39
2.2.3 Microplates.....	41
2.3 Tecniche per la deformazione di un'intera popolazione di cellule	42
2.3.1 Dispositivi di stretching a base di membrane.....	42
2.3.2 Applicazione di stress di taglio generati da flussi indotti	43
2.4 Altre tecniche di studio della meccanica cellulare	44
2.4.1 Microneedles	44
2.4.2 Sistemi Micro Elettro Meccanici.....	45
2.5 Considerazioni riassuntive e motivazioni della scelta	48
3. Progettazione e realizzazione dei dispositivi MEMS.....	53
3.1 Realizzazione dei dispositivi mediante il processo PolyMUMPs	54
3.1.1 Il processo PolyMUMPs	54
3.1.2 Lo stripping ed il rilascio delle strutture	56
3.2 Progettazione del dispositivo	57
3.2.1 MEMS di prima generazione	58
3.2.1.1 Piattaforma per la deposizione della cellula.....	58

3.2.1.2	<i>Motori per l'attuazione del dispositivo</i>	64
3.2.1.3	<i>Molle di ancoraggio</i>	70
3.2.1.4	<i>Outline complete dei MEMS di prima generazione</i>	72
3.2.2	MEMS di seconda generazione.....	74
3.2.2.1	<i>Problematiche relative all'attuazione in ambiente liquido</i>	75
3.2.2.2	<i>Progettazione dei MEMS di seconda generazione</i>	77
4.	Post-processing dei dispositivi	84
4.1	Funzionalizzazione del substrato	84
4.1.1	Introduzione al problema	84
4.1.2	Soluzioni proposte	87
4.1.3	Verifica sperimentale.....	89
4.1.4	Funzionalizzazione locale	92
4.2	Collegamento meccanico dei MEMS.....	95
4.2.1	Collegamento mediante wire bonding	95
4.2.2	Collegamento mediante fibra di carbonio.....	97
4.2.2.1	<i>Adesione della fibra mediante bonding d'oro</i>	97
4.2.2.2	<i>Adesione della fibra mediante adesivo</i>	98
4.3	Collegamento elettrico dei MEMS	99
5.	Caratterizzazione dei dispositivi	102
5.1	MEMS di prima generazione.....	102
5.1.1	MEMS biassiale con attuatore comb drive	102
5.1.2	MEMS biassiale con attuatore termico.....	103
5.1.3	MEMS pluriassiale con attuatore termico.....	110
5.2	MEMS di seconda generazione	116
5.2.1	Motori termici a 2 e a 4 serie di attuatori.....	116
5.2.2	Motore comb drive	118
6.	Sperimentazione con cellule viventi	120
6.1	Realizzazione di un laboratorio per colture cellulari	120
6.2	Manipolazione della singola cellula.....	123
6.3	Prove con cellule viventi	127
7.	Sviluppi futuri	130
7.1	Nuovi motori termici	130

7.2 Motori magnetici	131
7.3 Sistema di posizionamento per la generazione di forze controllate .	132

Conclusioni

Introduzione

Negli ultimi anni, le cellule sono state oggetto di studio approfondito e, in taluni casi, di esperimenti molto sofisticati. Tuttavia, benché si conosca molto circa la loro struttura, poche sono le informazioni sulla meccanica cellulare e sulla risposta cellulare agli stimoli meccanici. Le cellule, infatti, possono sentire forze meccaniche e convertirle in risposte biologiche, oppure, viceversa, è da tempo noto come segnali biologici e biochimici influenzino l'abilità cellulare nel sentire, generare e sopportare forze di tipo meccanico.

Gli studi sulla biomeccanica cellulare sono rapidamente evoluti nei decenni passati, con importanti implicazioni per la biotecnologia e la salute umana. Questi progressi sono stati resi possibili dalla creazione di nuove tecniche per l'applicazione e misura di forze e spostamenti nell'ordine rispettivamente dei piconewton e dei manometri, e da miglioramenti nelle tecniche di *bioimaging*. Le ricerche condotte nei decenni passati hanno portato alla comprensione delle connessioni tra le strutture, delle risposte meccaniche e delle funzioni biologiche dei differenti organi e tessuti come, ad esempio, il cuore, le ossa, i polmoni, le cartilagini, i vasi sanguigni. Questi studi hanno inoltre portato a miglioramenti nelle diagnosi e nei trattamenti delle malattie ortopediche, cardiovascolari e respiratorie, fornendo una più ampia comprensione di come le funzioni biologiche del corpo siano relazionate alle meccaniche biosolide e biofluide. Sono tuttavia necessari ulteriori e più sistematici studi sulla deformazione, dinamica strutturale e traduzione mecano-chimica nelle cellule viventi, che si rivolgano, in particolare, all'analisi delle proprietà e del comportamento meccanico della singola cellula. Effettuando una ricerca mediante il servizio della U.S. National Library of Medicine PubMed, digitando la composizione di parole "Cell Mechanics" è possibile annoverare fra gli articoli pubblicati su riviste internazionali più di 190.000 lavori scientifici. Tuttavia, digitando la composizione di parole "Single Cell Mechanics" il risultato è di sole 826 pubblicazioni scientifiche di livello internazionale.

Negli ultimi anni sono stati ideati e realizzati svariati meccanismi per l'applicazione di forze meccaniche su cellule e la rilevazione delle conseguenti deformazioni. Questi sistemi, però, presentano dei limiti:

- la forza esercitata non è adeguata al fenomeno investigato;
- lo studio viene effettuato su un'intera popolazione di cellule;
- la forza è esercitata localmente e non sull'intera cellula.

Il presente lavoro di tesi, avente come obiettivo primo lo sviluppo, la progettazione e la realizzazione di un dispositivo per la sollecitazione meccanica della singola cellula e la rilevazione delle conseguenti deformazioni, si è focalizzato sullo studio di dispositivi che potessero bypassare i suddetti limiti. La scelta è ricaduta nei Sistemi Micro Elettro Meccanici, dal momento che, oltre ad avere dimensioni compatibili con le caratteristiche cellulari ed assicurare modesti costi realizzativi ed operativi, garantiscono:

- la possibilità di applicare forze in un ampio range (pN- μ N), bypassando i limiti degli *optical tweezers*, finora limitati alle centinaia di pN;
- la possibilità di effettuare studi sulla singola cellula, ed in particolare su cellule aderenti, a differenza di tecniche come gli *optical tweezers*, l'aspirazione con micropipette ed i *microplates*, operanti solamente su cellule in sospensione;
- la possibilità di stimolare l'intera cellula, e non soltanto una porzione locale di questa, come avviene per la microscopia a forza atomica e per la *magnetizing twisting cytometry*.

La prima fase operativa è stata quindi rivolta allo studio della tecnologia MEMS, delle tecniche realizzative e delle possibilità/limiti della tecnologia stessa. Sono stati progettati diversi dispositivi, concepiti in maniera analoga ad una tradizionale macchina universale per test meccanici, le cui principali parti costituenti sono: il sistema di afferraggio del campione, che deve garantirne il sicuro bloccaggio, evitando lo scivolamento in fase di prova; la traversa mobile, della quale si possano controllare la corsa e la velocità di movimentazione; la cella di carico, per la rilevazione della sollecitazione applicata istante per istante sul campione. Il lavoro si potrebbe quindi riassumere nella miniaturizzazione di una macchina macroscopica per test meccanici.

Il secondo step operativo è stato l'adeguamento del dispositivo affinché potesse operare negli ambienti biologici cellulari. Nonostante, infatti, le premesse si prospettassero rosee, con quelli che saranno definiti MEMS di prima generazione non si sono potuti effettuare test su cellule viventi, dal momento che i motori impiegati per la movimentazione del sistema presentavano una serie di problematiche quando attuati in soluzioni saline quali i medium per colture cellulari. Per questo motivo sono stati progettati nuovi dispositivi, definiti di seconda generazione, che consentissero di superare i limiti dei primi. La soluzione è stata trovata nello sdoppiamento del dispositivo in due MEMS, cosicché motore e cella d'analisi potessero operare in due ambienti differenti, rispettivamente aria e soluzione salina.

Last, but not least, sono state acquisite e messe a punto le tecnologie che potessero consentire di operare con cellule viventi in un Dipartimento in cui le attività di ricerca erano rivolte essenzialmente allo studio dei materiali: è stato così condotto uno studio rivolto all'individuazione di un substrato adeguato per le cellule in esame, tale da non modificarne il comportamento, garantendone tuttavia l'adesione ed il sicuro ancoraggio al dispositivo; è stato allestito presso il Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali un laboratorio per colture cellulari; è stata infine messa a punto una tecnica per la manipolazione di singole cellule.

Capitolo 1.

La cellula e la biomeccanica cellulare

There is plenty of room at the bottom

Richard Feynman, 1959

1.1 La cellula

1.1.1 La cellula: organuli e strutture costituenti

I primi biologi credevano che le cellule fossero costituite da un gel omogeneo detto protoplasma. Con l'introduzione del microscopio elettronico e di altri strumenti moderni è stato possibile migliorare la conoscenza del mondo cellulare interno (Heuser and Kirschner, 1980).

Ora è noto che la cellula è una struttura altamente organizzata e complessa, possiede una sua "centrale elettrica", un suo sistema interno di trasporto e persino un sistema di autodistruzione. Al giorno d'oggi non si usa più il termine protoplasma, in quanto troppo generico. La porzione di protoplasma al di fuori del nucleo viene chiamata citoplasma, mentre quella all'interno del nucleo viene chiamata nucleoplasma. Molti organuli sono sospesi nella componente fluida del citoplasma, normalmente chiamata citosol. Il termine citoplasma comprende sia il citosol che tutti gli altri organuli, eccetto il nucleo.

Gli organismi viventi possono essere divisi in due gruppi a seconda della struttura e complessità delle loro cellule. Gli eucarioti sono organismi le cui cellule contengono organuli rivestiti da una membrana, dei quali il più importante è il nucleo, in cui è

localizzato il materiale ereditario o DNA. Eucarioti significa vero nucleo. Il DNA dei procarioti non è racchiuso in un nucleo e non sono presenti altri organuli membranosi. Queste cellule, che comprendono anche i batteri, sono in genere molto più piccole rispetto alle cellule eucarioti.

Il **nucleo**, l'organo più importante della cellula, ha una forma sferica od ovoidale e ha un diametro medio di 5 micron. L'involucro nucleare è costituito da due membrane concentriche che separano ciò che è contenuto nel nucleo dal citoplasma circostante. Queste membrane si fondono tra loro ad intervalli e formano pori nucleari che permettono il passaggio di materiali dal citoplasma al nucleo e viceversa. Tale processo è altamente selettivo e permette il passaggio attraverso queste aperture solo di molecole specifiche. Quasi tutto il DNA cellulare è localizzato all'interno del nucleo. Le molecole di DNA costituiscono i geni che contengono, in forma chimica, le informazioni codificate per la produzione di tutte le proteine necessarie per la cellula. Il nucleo controlla la sintesi proteica (che avviene nel citoplasma) inviando al citoplasma, attraverso l'involucro nucleare, molecole di RNA messaggero che sono la copia di quella parte di geni che codifica le proteine.

L'RNA messaggero può attaccarsi a piccole strutture complesse di forma sferica, chiamate **ribosomi**, per svolgere la sintesi proteica. I ribosomi sono costituiti da due subunità, una maggiore ed una minore, ciascuna delle quali contiene un tipo particolare di RNA. Negli eucarioti le subunità ribosomiali vengono assemblate in una particolare regione del nucleo detta nucleolo, nella quale viene sintetizzato l'RNA ribosomiale. Le proteine ribosomiali vengono invece sintetizzate nel citoplasma e da lì trasportate nel nucleolo. Questi componenti vengono assemblati nelle subunità maggiore e minore, le quali escono dal nucleo attraverso pori nucleari per entrare nel citoplasma dove si associano l'una all'altra per formare un ribosoma completo.

Il sistema di membrane interne o **sistema endomembranoso** (fig. 1.1) è costituito da membrane funzionalmente diverse che comunicano le une con le altre: alcune sono collegate fisicamente, altre comunicano tramite vescicole che gemmano da queste e si fondono con le membrane di strutture vicine. Svariate sono le strutture che vanno a costituire il sistema membranoso interno, tra cui il reticolo endoplasmatico, la membrana nucleare esterna, il complesso del Golgi, i lisosomi ed i vacuoli. La membrana

plasmatica, pur non essendo interna, partecipa comunque alle attività del sistema di membrane interne.

Al microscopio elettronico è possibile distinguere due tipi di **reticolo endoplasmatico**, che pur avendo funzioni diverse, hanno membrane e spazi interni connessi tra di loro senza soluzione di continuità. Il reticolo endoplasmatico rugoso appare tale in quanto sulla sua superficie si trovano i ribosomi. Il reticolo endoplasmatico liscio, tubolare e privo di ribosomi, è invece la sede primaria del metabolismo dei fosfolipidi, degli steroidi e degli acidi grassi. Inoltre è ricco di enzimi detossificanti che degradano composti chimici cancerogeni trasformandoli in prodotti idrosolubili che vengono escreti dal corpo. Alcune cellule contengono una grande quantità di reticolo endoplasmatico liscio. Un esempio è dato dalle cellule epatiche umane, le quali sintetizzano ed elaborano buona parte del colesterolo e di altri lipidi e fungono da centro di detossificazione dell'organismo.

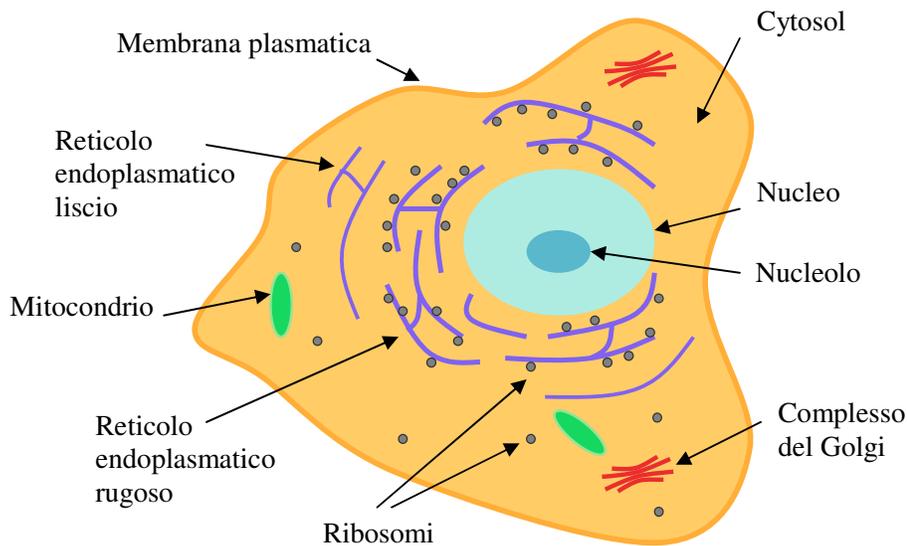


Fig. 1.1. Organuli e strutture costituenti una cellula eucariote

Il **complesso del Golgi** -noto anche come apparato del Golgi- fu descritto per la prima volta nel 1898 dal microscopista italiano Camillo Golgi, che scoprì una metodica per colorare in maniera specifica questo organulo. Nella maggior parte delle cellule il complesso del Golgi è costituito da pile di sacche membranose appiattite che, in alcune regioni, possono apparire rigonfie in quanto piene di prodotti cellulari. Ciascuna di queste sacche ha uno spazio interno detto lume. Il complesso del Golgi funziona principalmente

come apparato per la trasformazione, selezione e modificazione delle proteine, le quali possono avere destini diversi: alcune vengono secrete dalla cellula, altre vanno a far parte della membrana plasmatica, altre ancora vengono convogliate ad altri organuli del sistema endomembranoso. Le proteine, dopo essere state sintetizzate dai ribosomi attaccati al reticolo endoplasmatico, vengono trasportate al complesso del Golgi mediante piccole vescicole di trasporto che si formano nelle membrane del reticolo endoplasmatico. Dopo che le vescicole si sono fuse con le membrane del complesso del Golgi più vicine al nucleo, le proteine passano attraverso gli altri strati dell'organulo e vengono modificate in vari modi dando origine a molecole biologiche complesse.

I **lisosomi** sono piccole sacche piene di enzimi digestivi disperse nel citoplasma delle cellule animali. Gli enzimi in essi contenuti degradano le molecole complesse che si formano sia all'interno che all'esterno della cellula. Queste comprendono lipidi, proteine, carboidrati ed acidi nucleici. All'interno dei lisosomi sono stati identificati più di 40 enzimi diversi, la maggior parte dei quali è attiva in condizioni di acidità (pH 5). Nelle cellule che necessitano di energia, i lisosomi possono degradare gli organuli in modo tale che i loro componenti possano essere utilizzati come fonte energetica. I lisosomi possono anche degradare molecole estranee che sono state ingerite dalla cellula. Questo è quello che si verifica quando un globulo bianco ingerisce un batterio o i resti di una cellula morta: il materiale estraneo viene racchiuso in vescicole formatesi dalla membrana plasmatica, quindi uno o più lisosomi si fondono con queste vescicole contenenti il materiale estraneo formando una vescicola più grande detta lisosoma secondario. Infine, potenti enzimi digestivi del lisosoma vengono a contatto con le molecole estranee degradandole nei loro componenti base.

Quando una cellula assume energia dall'ambiente che la circonda, questa si trova generalmente sotto forma di energia chimica contenuta nelle molecole di cibo (come il glucosio). Tale energia deve essere convertita in forme che possano essere meglio utilizzate dalle cellule. Alcuni di questi processi di conversione avvengono nel citosol, altri invece nei **mitocondri**, detti anche trasduttori di energia in quanto facilitano la conversione dell'energia da una forma ad un'altra. I mitocondri sono quindi organuli complessi nei quali avviene la respirazione cellulare, respirazione aerobica che necessita di ossigeno ed ha come prodotti finali atomi di carbonio rilasciati sotto forma di anidride carbonica. I mitocondri hanno dimensioni variabili da 2 a 8 micron di lunghezza, sono in grado di cambiare forma molto rapidamente e si replicano per divisione. Ciascuno di essi

è circondato da una doppia membrana che dà origine a due compartimenti distinti: lo spazio intermembranoso che si viene a formare tra le membrane interna ed esterna, e la matrice, che è il compartimento circondato dalla membrana interna. La membrana mitocondriale esterna è liscia, in un certo senso paragonabile ad un setaccio attraverso il quale possono passare molecole di piccole dimensioni. Al contrario, la membrana mitocondriale interna è selettivamente permeabile, può essere cioè attraversata solo da alcuni tipi di molecole. Nella matrice sono contenuti enzimi che demoliscono le molecole provenienti dal cibo convertendo la loro energia in altre forme di energia chimica.

Analizzando ed osservando la crescita delle cellule in laboratorio si può osservare come queste cambino forma ed in molti casi si spostino. La forma e la capacità di movimento sono in gran parte determinate da una complessa rete di proteine fibrose chiamata **citoscheletro**. I filamenti proteici che costituiscono la rete citoscheletrica sono stati classificati sulla base delle loro dimensioni relative e ne sono stati individuati due tipi principali: i microfilamenti, detti anche filamenti di actina, con un diametro di 7 nm, e i microtubuli con un diametro di 25 nm. Sia i microfilamenti che i microtubuli sono costituiti da fibre, a loro volta costituite da proteine globulari che si possono assemblare e disassemblare molto rapidamente. Sebbene entrambi i tipi di fibre siano tra i componenti principali del citoscheletro, questi giocano un ruolo importante anche nella formazione di altre strutture che permettono il movimento e l'organizzazione cellulare. In molte cellule animali esiste una terza classe di filamenti detti filamenti intermedi di diametro compreso tra 8 e 10 nm, che sono costituiti da subunità di proteine fibrose e sono più stabili rispetto ai microtubuli e ai microfilamenti.

I **microtubuli** costituiscono l'impalcatura della cellula, determinandone così la forma. Il microtubulo cresce in dimensioni per aggiunta di dimeri di subunità proteiche dette tubuline. Ciascun dimero è costituito da due subunità molto simili, α - e β -tubulina. I dimeri si aggiungono di preferenza ad una estremità (chiamata "plus", oppure estremità a crescita veloce) del cilindro. L'estremità opposta, quella a crescita lenta, è detta invece minus. I microtubuli vengono disassemblati per rimozione di dimeri che possono essere riciclati per formare microtubuli in altre parti della cellula. I microtubuli sono strutture estremamente versatili. Oltre a svolgere un ruolo strutturale nella formazione del citoscheletro, sono coinvolti nel movimento dei cromosomi durante la divisione cellulare, costituiscono le "autostrade" per molti altri tipi di movimenti intracellulari (Ingberg,

1993) e sono i principali componenti strutturali di ciglia e flagelli, strutture utilizzate dalle cellule per muoversi. I microtubuli, per espletare la loro funzione strutturale o partecipare al movimento delle cellule, si devono ancorare ad altre parti della cellula. Nelle cellule che non si stanno dividendo i microtubuli appaiono stendersi dalla regione detta centro cellulare o centro di organizzazione dei microtubuli, a cui sono associate, in molte cellule animali, due strutture dette centrioli. Queste strutture, dette anche strutture 9x3, sono disposte ad angolo retto l'una rispetto all'altra e sono costituite da 9 triplette di microtubuli disposte a formare un cilindro cavo. I centrioli vengono duplicati prima della divisione cellulare e molto probabilmente svolgono un loro ruolo nell'assemblaggio dei microtubuli, sebbene la loro funzione specifica sia sconosciuta. La capacità dei microtubuli di assemblarsi e disassemblarsi rapidamente si vede durante la divisione cellulare, quando buona parte del citoscheletro sembra rompersi. Molte delle subunità di tubulina vengono riassemblate per formare il fuso, che serve da struttura portante per la distribuzione ordinata dei cromosomi durante la divisione cellulare.

I microtubuli fungono anche da traccia per il movimento degli organuli verso le diverse collocazioni all'interno della cellula. I mitocondri, le vescicole secretorie e di trasporto ed altri organuli, si attaccano ai microtubuli per essere trasportati in vari compartimenti cellulari lungo la rete microtubulare grazie a proteine ATP-dipendenti che fungono da "motori".

Dalla superficie di molte cellule si proiettano strutture sottili e mobili dotate di un movimento a frusta. Se una cellula possiede solo una o poche di queste appendici e queste sono relativamente lunghe in proporzione alle dimensioni della cellula, vengono chiamate flagelli. Se la cellula ha molte appendici corte, queste vengono dette ciglia. Sia le ciglia che i flagelli vengono utilizzati dalle cellule per muoversi in un ambiente acquoso o per muovere i liquidi e le particelle sulla superficie della cellula stessa. Le ciglia e i flagelli degli eucarioti sono costituiti entrambi da steli sottili ed allungati di forma cilindrica coperti da membrana plasmatica. La parte interna dello stelo è costituita da un gruppo di nove paia di microtubuli disposti lungo la circonferenza e due microtubuli al centro. I microtubuli si muovono scivolando appaiati gli uni sugli altri. La forza di scivolamento è data da proteine (subunità di dineina) attaccate ai microtubuli come tante piccole braccia, che sono in grado di utilizzare l'energia immagazzinata nell'ATP in modo tale da far muovere una coppia di microtubuli lungo un paio di microtubuli adiacenti, facendo così flettere avanti ed indietro tutta la struttura. In questo

modo, i microtubuli che si trovano su un lato del ciglio o del flagello si estendono di più rispetto a quelli dell'altro lato. Vi sono altri componenti del sistema che esercitano costrizioni in grado di provocare un movimento dei microtubuli dall'apice alla base che si trasforma in un movimento oscillatorio avanti indietro.

Alla base di ciascun ciglio o flagello si trova il corpo basale, struttura costituita da nove triplette di microtubuli disposti a formare un cilindro. Sia i corpi basali che i centrioli hanno una struttura 9 x 3. Sembra che il corpo basale sia la struttura organizzatrice delle ciglia e dei flagelli quando questi iniziano a formarsi. Alcuni dati sperimentali hanno dimostrato che il processo di crescita avviene per apposizione di subunità di tubulina alla sommità dei microtubuli piuttosto che alla base.

I **microfilamenti** sono fibre resistenti costituite da actina e da altre proteine ad essa associate. Nelle cellule muscolari l'actina si associa alla miosina per formare fibre in grado di permettere la contrazione muscolare (vedi definizione seguente di sarcomero). Nelle cellule non muscolari i microfilamenti di actina hanno funzioni diverse: associandosi ad altre proteine danno origine a fasci di fibre che fanno da supporto meccanico a varie strutture cellulari. Le fibre di actina di per sé non possono contrarsi ma possono provocare il movimento mediante assemblaggio o disassemblaggio rapidi. Molti tipi di cellule possiedono sulla loro superficie estroflessioni simili a dita, dette microvilli, che possono estendersi o ritirarsi in seguito alla polimerizzazione e depolimerizzazione delle fibre di actina contenute nei microvilli. I microfilamenti di actina associati a miosina sono utilizzati dalla cellula in attività transitorie come la divisione cellulare durante la quale la contrazione di un anello di actina complessata con la miosina causa la strozzatura della cellula dando luogo a due cellule figlie. Ciò avviene dopo che i microtubuli hanno separato i cromosomi duplicati.

Il **sarcomero** è l'unità contrattile del tessuto muscolare striato. I sarcomeri si dispongono uno dopo l'altro a formare dei fascetti contrattili chiamati miofibrille avvolti da una membrana, il sarcolemma. I sarcomeri sono quindi costituiti da due tipi di filamenti: quelli sottili di actina e quelli spessi di miosina. I filamenti sottili sono costituiti da due catene proteiche avvolte a spirale, mentre quelli spessi sono costituiti da più fascetti di miosina, a loro volta formati da due catene proteiche.

Un'estremità dei filamenti di miosina è rigonfia e prende il nome di testa della miosina ed ha due funzioni: si attacca ai filamenti di actina permettendo l'accorciamento del sarcomero e funge da enzima necessario alla scissione dell'ATP in ADP+Pi (fosfato inorganico), poiché la contrazione necessita di energia.

Il sarcomero si presenta come un'alternanza di bande chiare e bande scure: le prime sono costituite da filamenti di actina, le seconde, più interne, sono costituite da filamenti di actina e filamenti di miosina interposti tra di loro. Quando le fibre muscolari vengono stimolate, i filamenti di miosina, grazie alle teste, si legano ai filamenti di actina creando dei ponti trasversali. Le teste della miosina spingono verso l'interno i filamenti di actina, accorciando così il sarcomero.

I filamenti intermedi sono molto stabili e costituiti da fibre polipeptidiche resistenti che possono variare ampiamente di dimensioni a seconda dei diversi tipi di cellula e delle diverse specie animali. Si pensa che queste fibre rafforzino il citoscheletro e che siano più abbondanti in quelle zone della cellula soggette a stress meccanico. L'assemblaggio di questi filamenti è probabilmente irreversibile. Le cellule possono regolare la lunghezza dei filamenti intermedi mediante enzimi in grado di rompere questi polipeptidi in frammenti più piccoli. Non è chiaro se tali filamenti, oltre ad un ruolo strutturale, abbiano anche altre funzioni.

Il contenuto della cellula è racchiuso da una membrana, la **membrana plasmatica**. Tale membrana non è solo il naturale involucro della cellula, ma una struttura altamente specializzata che controlla il trasporto degli ioni e dei metaboliti entro e fuori la cellula e il flusso di informazioni di varia natura che arriva alla cellula.

La membrana cellulare ha uno spessore dell'ordine molecolare (4-6 nm) e consta di un doppio strato di fosfolipidi nel quale le proteine, lipoproteine e glicoproteine "galleggiano". Alcune strutture di natura proteica collegano l'ambiente interno della cellula con quello extra cellulare.

La membrana plasmatica svolge diverse funzioni:

- costituisce una barriera fisica che crea una compartimentazione strutturale e funzionale;
- tramite le glicoproteine e i glicolipidi esposti sulla superficie esterna, consente la ricezione dei segnali ed il riconoscimento cellula-cellula (comunicazioni

intercellulari di tipo sia elettrico che chimico ed organizzazione cellulare). L'attacco cellula-cellula si realizza infatti attraverso specifiche vie di giunzione che richiedono scambi di proteine;

- controlla la capacità delle cellule di interagire fra loro e di insediarsi in zone caratteristiche (i linfociti, ad esempio, percorrono i vasi sanguigni e linfatici secondo vie definite);
- trasporto selettivo di metaboliti e ioni dentro e fuori la cellula.

La **matrice extracellulare**, o ECM o colla cellulare, esiste in due forme: matrice interstiziale (es. tessuto connettivo) e membrana basale (es. nell'epitelio e nell'endotelio). Contiene come costituenti maggiori molecole collageniche, glicosamminoglicani, glicoproteine, elastina e proteoglicani. Le sue funzioni principali includono il supporto meccanico per l'ancoraggio cellulare, la determinazione dell'orientamento cellulare, il controllo della crescita cellulare, il mantenimento della differenziazione cellulare, il rinnovamento dell'impalcatura tessutale e la stabilizzazione del microambiente tessutale. Inoltre la ECM fornisce una via ad ogni cellula per influenzare il comportamento delle altre.

1.1.2 Adesione cellulare, spreading e locomozione

Le molecole di adesione sono costituite principalmente da proteine che rappresentano recettori transmembrana di tre domini:

- il dominio intracellulare, che interagisce con il citoscheletro;
- il dominio transmembrana;
- il dominio extracellulare, che interagisce con altre molecole di adesione dello stesso tipo (legame omofilico, o cellula-cellula) o di altro tipo (legame eterofilico, o cellula-matrice extracellulare).

A seconda della densità di proteine si può parlare di contatti focali, emidesmosomi, lamine esterne e membrane basali.

Per quanto riguarda l'interazione cellula-ECM, diverse sono le molecole coinvolte nel processo. La fibronectina è una delle molecole responsabili del collegamento tra la ECM e la superficie cellulare. E' una glicoproteina dimerica che possiede siti di attacco sia per il collagene che per i glicosamminoglicani. Ha un'estremità che presenta un'alta affinità

per una famiglia di proteine intrinseche di membrana, i recettori per la fibronectina. E' presente ad alte concentrazioni sulla superficie delle cellule connettivali. Le lamine basali contengono un'altra proteina di adesione cellulare detta laminino, assemblata sotto forma di reticoli. Le lamine basali hanno siti di legame per i recettori della superficie cellulare e per il collagene.

I principali recettori della superficie cellulare responsabili dell'attacco della cellula alla matrice extracellulare sono le integrine (Fig. 1.2 a), proteine transmembrana costituite da due subunità alfa e beta unite da un legame non covalente (sono state individuate 24 diverse subunità alfa e 9 differenti subunità beta, sebbene non siano state osservate tutte le combinazioni possibili). Le integrine presentano una costituzione tessuto-specifica. Esse sono in grado di riconoscere e legare componenti della matrice extracellulare quali collagene, fibronectina e laminina (dominio extracellulare: le integrine legano specifiche sequenze proteiche della fibronectina e di altre proteine adesive, che a loro volta possono legarsi a substrati solidi e a componenti della matrice extracellulare. In questo modo è possibile collegare il citoscheletro con siti adesivi della ECM, attraverso l'intermediazione della fibronectina).

I microfilamenti del citoscheletro sono connessi con la membrana plasmatica tramite integrine (dominio intracellulare: costituito da due bracci che possono essere definiti meccanico, in quanto in risposta a determinati segnali agisce sui filamenti di actina, e biochimico, in quanto induce particolari attività enzimatiche in relazione al segnale ricevuto). Il dominio transmembrana è invece il vero punto di snodo tra l'ambiente al di fuori della cellula e l'ambiente interno alla cellula, dove si verificano interazioni meccaniche tra gli altri due domini dell'integrina.

In un ambiente fisiologico, l'adsorbimento di proteine sulla superficie di un substrato solido precede sempre l'adesione cellulare. Le proteine pre-adsorbite, in combinazione con le proteine prodotte dalle cellule, e dipendentemente dalle proprietà del substrato, determinano la forza dell'adesione.

Siti adesivi tra cellule e substrato possono essere classificati come:

1. Adesione focale: adesione molto forte. Viene coinvolta la fibronectina
2. *Close contact*: in genere circondano l'adesione focale e rappresentano siti meno forti di adesione.

3. Contatto con la ECM: legami o ponti formati da componenti della ECM che connettono la parte ventrale della cellula con il sottostante substrato.

A causa della topografia rugosa della membrana cellulare, i ligandi deputati all'adesione cellulare e i loro recettori sono generalmente grandi strutture multidominio (dai 30 ai 50 nm) che si proiettano dalla superficie dello strato bilipidico per superare l'interferenza sterica e consentire le connessioni tra cellule (Evans and Calderwood, 2007).

I processi di interazione cellula-cellula (Fig. 1.2 b), sono processi selettivi mediati da proteine transmembrana dette molecole di adesione cellulare, divise in quattro gruppi principali: selettine, integrine, immunoglobuline e caderine.

Selettine, integrine e caderine richiedono Ca^{2+} e Mg^{2+} per funzionare. Selettine, immunoglobuline ed integrine mediano adesioni transitorie; in particolare, le selettine riconoscono carboidrati specifici presenti sulla superficie cellulare.

La superfamiglia delle molecole di adesione di tipo immunoglobulinico è in grado di instaurare sia legami omofilici che eterofilici, legando integrine o diversi tipi di immunoglobuline.

Le caderine sono responsabili soprattutto della formazione di giunzioni stabili tra le cellule dei tessuti; esse, infatti, uniscono tra di loro cellule dello stesso tipo attraverso legami di tipo omofilo.

Le membrane di cellule contigue presentano una serie di dispositivi specializzati che permettono un contatto più stretto e, in alcuni casi, anche scambi tra cellula e cellula.

Si distinguono due classi di giunzioni cellulari:

- 1) giunzioni aderenti: desmosomi, emidesmosomi, fasce aderenti, fasce occludenti
- 2) giunzioni comunicanti: giunzioni serrate

Le giunzioni aderenti tengono insieme le cellule e funzionano come cerniere intercellulari che mantengono le cellule in posizioni fisse all'interno dei tessuti.

Le giunzioni occludenti chiudono gli spazi intercellulari alla diffusione, formando una specie di barriera che impedisce il flusso diretto di ioni e molecole.

Le giunzioni comunicanti formano canali aperti nelle membrane plasmatiche di cellule adiacenti, permettendo la diffusione diretta di ioni o piccole molecole da una cellula all'altra.

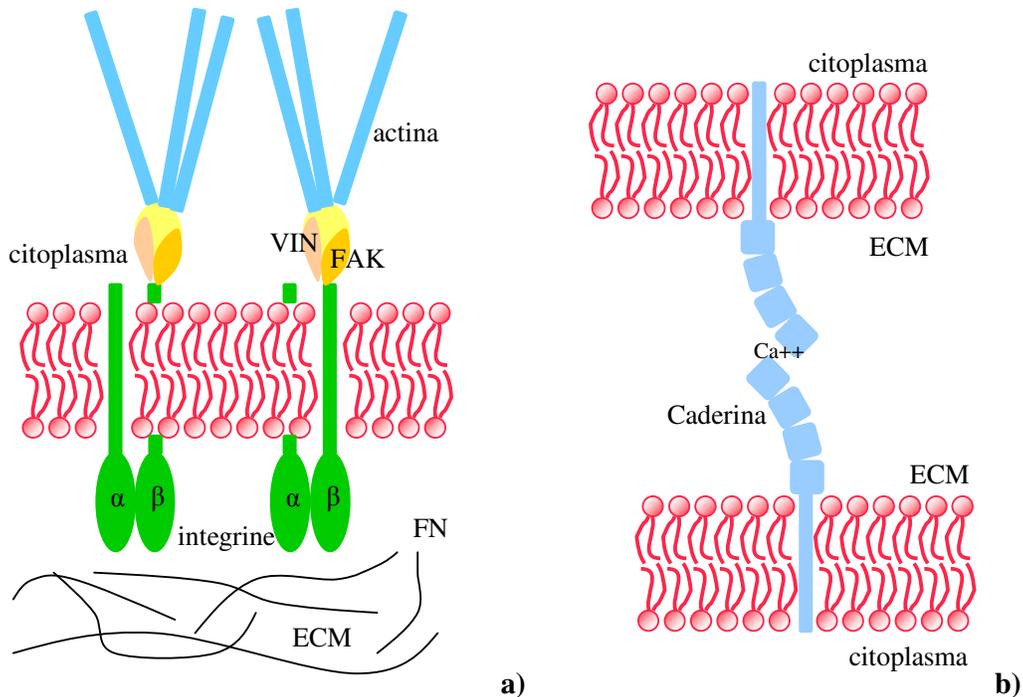


Fig. 1.2. a) Domini cellula-ECM; b) domini cellula-cellula

Lo *spreading* cellulare è un processo che unisce l'attività adesiva e la rete contrattile intracellulare (citoscheletro). Durante la fase di appiattimento, si formano inizialmente delle protrusioni citoplasmatiche, all'apice delle quali prendono forma le adesioni focali; si arriva così allo stadio finale in cui le protrusioni si appiattiscono e si allargano fino a far assumere alla cellula una forma completamente appiattita. Quando una cellula incontra la membrana di un'altra cellula, il contatto inibisce il processo bloccandolo. Apparentemente sembra che il contatto tra membrane induca un'inibizione dell'attività contrattile delle proteine coinvolte. L'adesione cellulare e lo *spreading* sono influenzati dalle caratteristiche fitochimiche del sottostante substrato solido. L'energia libera di superficie del substrato è collegata allo *spreading* cellulare. Substrati idrofobici diminuiscono questo fenomeno che viene invece favorito da superfici idrofiliche in presenza e assenza di proteine adsorbite.

1.2 La biomeccanica cellulare

Secondo una definizione largamente condivisa, la biomeccanica è la scienza multidisciplinare che studia strutture e funzioni dei sistemi biologici (organismo, organi, tessuti e cellule) utilizzando le conoscenze e i metodi della meccanica. Così come la stessa meccanica, che può ricoprire tematiche che vanno dal trasporto di calore all'analisi vibrazionale, anche la biomeccanica ricopre un ampio settore di studi.

Alcuni fra i primi lavori sulla biomeccanica sono attribuiti ad Aristotele (384-322 a.C.). Nel suo libro "De incesso animalium" egli espone una completa descrizione dell'anatomia e della funzionalità degli organi inclusa una particolare ed accurata descrizione dell'azione peristaltica di un rene (Fung, 2006).

Anche Leonardo da Vinci (1452-1519) si interessò ai movimenti dell'uomo cercando di analizzarli secondo le leggi della meccanica di cui scrisse: "...è scienza nobile ed è utile più delle altre scienze e, come risulta, tutti i corpi viventi hanno possibilità di movimento ed agiscono secondo le sue leggi". Altri nomi illustri dell'ingegneria e della fisica che si sono dedicati a studi di biomeccanica sono Galileo Galilei, Renè Descartes, Robert Hooke (Hooke, 1665), Isaac Newton, ed altri.

Gli studi sulla meccanica della singola cellula sono rapidamente evoluti nei decenni passati, con importanti implicazioni per la biotecnologia e la salute umana. Questi progressi sono stati resi possibili dalla creazione di nuovi dispositivi per l'applicazione e misura di forze e spostamenti nell'ordine rispettivamente dei piconewton e dei nanometri e da miglioramenti nelle tecniche di *bioimaging*. Le ricerche condotte nei decenni passati hanno portato alla comprensione delle connessioni tra le strutture, delle risposte meccaniche e delle funzioni biologiche dei differenti organi e tessuti come, ad esempio, il cuore, le ossa, i polmoni, le cartilagini, i vasi sanguigni (Fung, 1993). Questi studi hanno inoltre portato a miglioramenti nelle diagnosi e nei trattamenti delle malattie ortopediche, cardiovascolari e respiratorie, fornendo una più ampia comprensione di come le funzioni biologiche del corpo siano relazionate alle meccaniche biosolide e biofluide. Sono tuttavia necessari ulteriori e più sistematici studi sulla deformazione, dinamica strutturale e traduzione mecano-chimica nelle cellule viventi (Bao and Sures, 2003).

Di particolare interesse nel presente lavoro di tesi è lo studio della biomeccanica e della meccanotrasduzione nelle cellule cardiache. La meccanotrasduzione nel miocardio è un fenomeno largamente studiato, dal momento che il sovraccarico meccanico del cuore è

cl clinicamente molto rilevante (Sussman *et al.*, 2002). La maggior parte dei casi di fallimento cardiaco sono dovuti alla perdita delle normali capacità cardiache (tipicamente in seguito ad un infarto del miocardio), con il risultato di un sovraccarico meccanico del rimanente miocardio vitale. Il sovraccarico meccanico causa una crescita non fisiologica dei cardiomiociti, presumibilmente compensativa, dal momento che consente alle suddette cellule accresciute di generare forze maggiori; questo può però portare ad una disfunzione meccanica ed al conseguente fallimento del tessuto. Studi di miociti cardiaci sovraccaricati hanno rivelato numerosi utili percorsi patologico-fisiologici. Sadoshima *et al.* (1993) hanno trovato che i cardiomiociti possono rilasciare angiotensina, sostanza che agisce come fattore di crescita. La meccanotrasduzione dei cardiomiociti è inoltre fortemente accoppiata ai segnali dipendenti dal calcio, come la CaM chinasi II, che si manifestano con rapidi cambiamenti del calcio citoplasmatico quando le cellule sono sottoposte a sollecitazioni meccaniche (Tavi *et al.*, 2001).

Si descrivono di seguito due dei principali filoni di ricerca della biomeccanica cellulare, interessanti ai fini del presente lavoro di tesi: i più accreditati modelli matematici che spiegano il comportamento dell'intera cellula quando sottoposta a sollecitazioni meccaniche ed i meccanismi della meccanotrasduzione, ovvero della capacità cellulare di rilevare e rispondere agli stimoli meccanici con risposte di tipo biochimico.

1.2.1. Modelli meccanici cellulari

I modelli cellulari sviluppati dai diversi Autori derivano generalmente da un approccio micro-nanostrutturale oppure da un approccio continuo (Lim *et al.*, 2006). Il primo considera il citoscheletro come il principale componente strutturale ed è particolarmente sviluppato per lo studio della meccanica del citoscheletro in cellule aderenti (Satcher and Dewey, 1993; Stamenovic and Ingber, 2002). L'approccio continuo, invece, tratta la cellula come un materiale comprimibile con proprietà omogenee continue. Da osservazioni sperimentali, si derivano i modelli appropriati dei materiali costituenti, e così, i parametri associati. Nonostante quest'ultimo approccio fornisca una minore comprensione dei complessi eventi a livello meccanico-molecolare, esso è più facile e diretto da utilizzare nella valutazione delle proprietà meccaniche della cellula qualora sia richiesta l'analisi della risposta biomeccanica a livello cellulare.

I modelli meccanici continui sviluppati per le cellule viventi si possono riassumere nelle tre seguenti principali tipologie:

1. *Cortical shell - liquid core* (o *liquid drop*)
2. Modelli solidi (elastico e viscoelastico)
3. Modelli derivati frazionari (*structural damping*)

I modelli *cortical shell - liquid core* sono stati sviluppati conseguentemente ai risultati reologici cellulari ottenuti mediante l'aspirazione con micropipette. Da queste osservazioni si sono derivati i seguenti modelli:

- il modello di goccia di liquido newtoniano per i leucociti (Yeung and Evans, 1998), che assume che l'interno della cellula si comporti come un liquido viscoso omogeneo newtoniano e considera la corteccia cellulare come uno strato fluido viscoso anisotropo con tensione statica, ma senza resistenza a flessione;
- il modello composto di goccia di liquido newtoniano sviluppato da Dong *et al.* (1991) e Hochmuth *et al.* (1993), che considera la cellula eucariote come una struttura a tre strati: la membrana plasmatica e l'ectoplasma (la parte più esterna e più densa del citoplasma) costituiscono lo strato più esterno di spessore $0.1 \mu\text{m}$ circa (Zhelev *et al.* 1994), che si trova sotto costante stato di tensione; lo strato centrale è costituito dall'endoplasma (la parte più interna e meno densa del citoplasma), una sorta di fluido che rappresenta la regione più soffice della cellula; lo strato più interno è costituito dal nucleo e dal circostante citoscheletro, anch'esso sotto costante tensione;

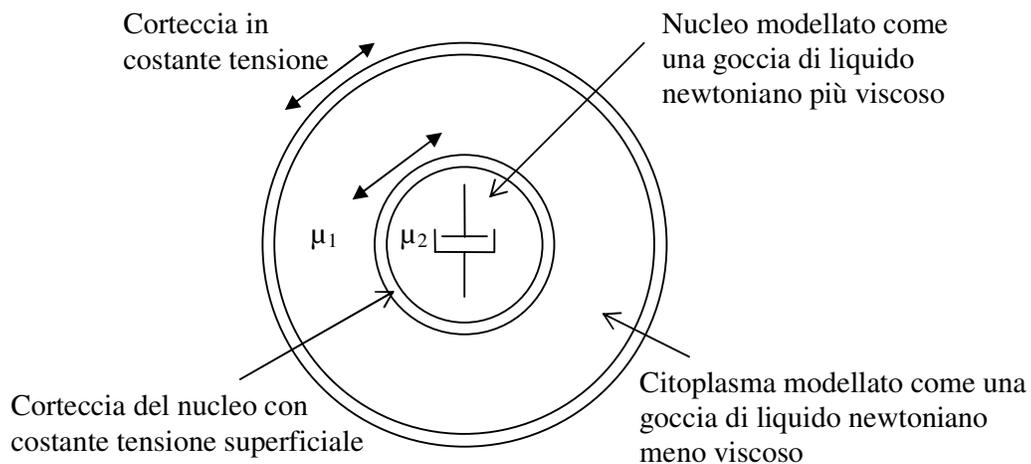


Fig. 1.3. Modello composto di goccia di liquido

- il modello di goccia liquida assottigliata a taglio, sviluppato da Tsai *et al.* (1993) analizzando la dipendenza dell'apparente viscosità citoplasmatica dalla velocità di taglio quando soggetta a grandi deformazioni; tale modello schematizza la corteccia cellulare come uno strato sotto costante tensione ed il citoplasma come una goccia di liquido soggetta ad assottigliamento a taglio;
- il modello di Maxwell di goccia liquida, che tiene conto delle piccole ed iniziali deformazioni e spiega l'iniziale rapido ingresso elastico della cellula durante la fase di aspirazione nella micropipetta. Dong *et al.* (1988) hanno così determinato il modello di corteccia prestressata contenente un fluido con comportamento viscoelastico secondo il modello di Maxwell.

La caratteristica più evidente dei modelli solidi se comparati ai modelli *cortical shell-liquid core* è data dal fatto che la cellula è tipicamente considerata omogenea e non si considera lo strato corticale esterno. Le basi sperimentali per i modelli solidi risiedono nella possibilità di raggiungere l'equilibrio dopo una certa quantità di sollecitazione. I modelli materialistici adottati includono il modello del solido elastico incomprimibile e del solido viscoelastico. Il primo è un modello semplificato in cui si trascura il fattore temporale, è generalmente inadeguato per descrivere la meccanica cellulare, ma viene utilizzato come punto di partenza per la soluzione viscoelastica (Fung, 1965).

Il modello solido viscoelastico omogeneo è stato proposto da Schmid-Schonbein *et al.* (1981) per studiare le piccole deformazioni di leucociti umani sottoposti ad aspirazione con micropipette. Il modello è rappresentato da due molle in parallelo, delle quali una è in serie con un pistone. Nonostante questo modello sia stato originariamente proposto per modellare il comportamento dei leucociti, studi successivi hanno evidenziato che i leucociti possono essere meglio descritti utilizzando il modello della goccia liquida.

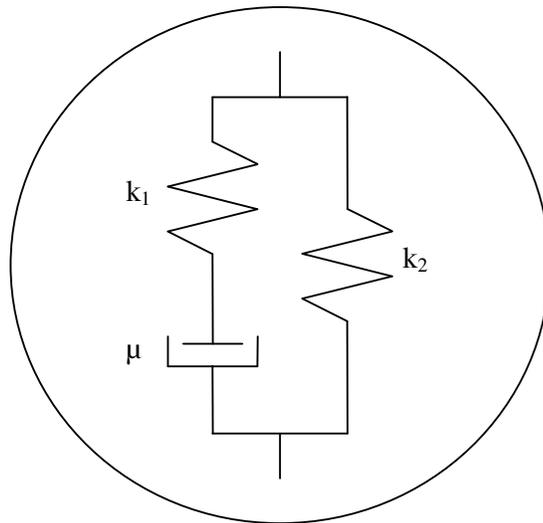


Fig. 1.4. Modello del solido viscoelastico

I modelli derivati frazionari di *damping* (smorzamento) strutturale sono generalmente ottenuti impiegando condizioni di sollecitazione transitorie, ad esempio creep o rilassamento. Dal momento che le cellule sono frequentemente soggette a forze dinamiche nel loro ambiente fisiologico, anche il loro comportamento nelle suddette condizioni acquista particolare interesse. I risultati sperimentali hanno evidenziato una dipendenza dalla frequenza secondo una legge esponenziale, con esponente variabile fra 0.1 e 0.4. Il modulo dinamico ha evidenziato un comportamento esponenziale simile a bassa frequenza (<10 Hz), ma con una componente newtoniana viscosa che diventa importante alle alte frequenze (Fabry *et al.*, 2003; Alcaraz *et al.*, 2003). Tale comportamento non può essere spiegato con i modelli molla-pistone (ad esempio il modello di Newton, Maxwell ed i modelli solidi lineari) dal momento che questi sovrastimerebbero sempre la dipendenza dalla frequenza (Pritz, 1996). Per modellare il comportamento reologico osservato per le cellule aderenti è stata quindi proposta un'equazione esponenziale di *damping* (smorzamento) strutturale (Fabry *et al.*, 2001).

I modelli meccanici sovra esposti schematizzano la cellula come una struttura costituita da una membrana elastica che circonda un citoplasma omogeneo, che può essere viscoso, viscoelastico od elastico, considerando talvolta il nucleo al centro. Queste visioni della cellula, spregiativamente paragonate da Ingberg (2003) ad un “pallone in tensione riempito di gelatina”, dal momento che ignorano le microstrutture interne, sono di scarsa

utilità quando si cerca di comprendere come le forze meccaniche regolino il comportamento cellulare. E' necessario quindi ricercare un modello della cellula che consenta di mettere in relazione la meccanica alla chimica a livello molecolare e di tradurre questa descrizione della cellula in termini matematici. Il modello micro-nanostrutturale più accreditato per descrivere il citoscheletro di cellule aderenti è stato proposto da Stamenovic *et al.* nel 1996 con il nome di *tensegrity*, o *tension integrity*. Altri modelli accreditati sono il modello della rete di cavi in tensione (Coughlin and Stamenovic, 2003) e della schiuma a celle aperte (Satcher and Dewey, 1996).

Tensegrity è un principio costruttivo descritto per la prima volta dall'architetto R. Buckminster Fuller (Fuller, 1961) e visualizzato per la prima volta dallo scultore Kenneth Snelson (Snelson, 1996). Fuller definisce sistemi *tensegrity* quelle strutture che stabilizzano la loro forma secondo una tensione continua, o intergrità tensionale, piuttosto che secondo una compressione continua (come avviene, ad esempio, in un arco di pietre). L'evidente semplicità di queste sculture ha condotto a descrivere l'architettura *tensegrity* come una rete in tensione di componenti strutturali che resiste alle distorsioni di forma e si stabilizza incorporando altri elementi di supporto che resistono a compressione. Secondo la definizione di Fuller, il modello *tensegrity* include due principali classi strutturali: prestressate e geodetiche. Le prime mantengono le loro giunture in una posizione come risultato di un pre-tensionamento (pre-esistente stress di trazione o tensione isometrica) all'interno della struttura. Le seconde triangolano i loro componenti strutturali e li orientano lungo geodetiche (percorsi minimi) secondo movimenti geometricamente costretti. Come illustrato in figura 1.5, il modello di *tensegrity* cellulare propone che l'intera cellula sia una struttura pretensionata, nonostante vi si trovino anche strutture geodetiche su una scala dimensionale inferiore. Nel modello, le forze di trazione hanno origine dai microfilamenti del citoscheletro e dai filamenti intermedi, e tali forze sono bilanciate dagli elementi strutturali interconnessi che resistono a compressione, più specificatamente, i microtubuli che fungono da montanti (puntoni) interni e i domini di adesione alla matrice extracellulare. Tuttavia, filamenti individuali possono avere una duplice funzione e di conseguenza sopportare sia stati tensionali che di compressione nei differenti contesti strutturali o a differenti scale dimensionali.

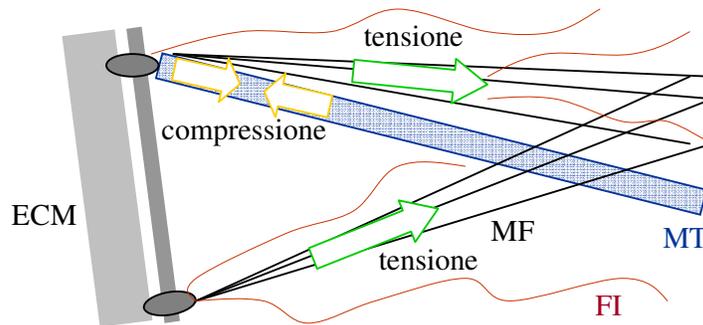


Fig. 1.5. Modello di tensegrity

1.2.2 La meccanotrasduzione

L'analisi della meccanotrasduzione cellulare, ovvero il meccanismo mediante il quale le cellule convertono segnali meccanici in risposte di tipo biochimico, si è focalizzata sull'identificazione di molecole e componenti cellulari meccanosensibili. È stato dimostrato come canali ionici attivati da stress, integrine, caderine, recettori di crescita, motori di miosina, filamenti del citoscheletro, nucleo, matrice extracellulare, e numerose altre strutture e molecole di trasmissione dei segnali contribuiscano alla risposta della meccanotrasduzione. Tuttavia poco ancora si conosce sul funzionamento delle diverse molecole all'interno del contesto strutturale più generale, cellulare, tissutale e degli organi, che porta alla produzione dell'organizzato comportamento cellulare richiesto per la meccanosensibilità, l'embriogenesi ed il controllo fisico. Impressionanti sono stati i progressi degli ultimi anni nelle più importanti aree di ricerca –si è dimostrato come numerose molecole e strutture subcellulari mediano la rilevazione dei segnali e la conversione mecano-chimica su scala nanometrica- ma rimane ancora da chiarire come l'intera cellula processi queste informazioni su scala molecolare ed orchestri una risposta rilevante dal punto di vista fisiologico nel contesto dell'architettura multiscala dell'intero corpo umano (Ingberg, 2006). Tuttavia, analizzando particolari funzioni meccanosensibili come l'udito e l'equilibrio, si è potuto comprendere come la capacità di rilevare stimoli meccanici dipenda soprattutto dall'organizzazione architettonica dell'intero organo sensoriale e del suo tessuto connettivo specializzato così come dalla struttura delle singole cellule sensoriali e molecole mecano-sensibili.

La risposta cellulare agli stimoli meccanici richiede almeno due componenti distinti: un elemento o una struttura che siano direttamente alterati o modificati dalla forza applicata ed un secondo elemento che trasmetta l'informazione da questo "sensore meccanico" ad

un target che può essere ad esempio un sito di inizio trascrizione nel nucleo oppure una proteina citoplasmatica che rimodella il citoscheletro. Il secondo elemento può anche essere meccanico o può coinvolgere la stessa serie di reazioni intracellulari che mediano l'attivazione cellulare per mezzo di segnali biochimici.

Un modello della meccano-sensibilità propone che le cellule siano una sorta di “rete metallica dura”, ovvero che lo spazio citoplasmatico sia interconnesso da una rete di fibre elastiche che consente alle strutture interne come la cromatina di rispondere direttamente ed immediatamente alle forze applicate alla membrana cellulare (Maniotis *et al.*, 1997). La rilevazione di stimoli meccanici non richiede tuttavia che i segnali siano diversi da quelli iniziati da stimoli chimici. Parecchi recenti studi hanno dimostrato come i più tradizionali messaggi secondari, come l'aumento della concentrazione nel citoplasma di ioni Ca^{2+} (Munevar *et al.* 2004), avvengano dopo sollecitazioni meccaniche, suggerendo come gli stimoli meccanici possano segnalare i loro effetti cellulari per mezzo dei messaggi intracellulari utilizzati dai ligandi solubili.

Si ritiene che le strutture cellulari deputate alla rilevazione di forze siano sia proteine che lipidi. La struttura generalmente implicata nella rilevazione di stimoli meccanici è il citoscheletro, o più precisamente, la connessione tra la matrice extracellulare e il citoscheletro costituita da proteine transmembrana (Janmey and Weitz, 2004). In questo complesso, tre proteine meccano-sensibili sono legate in serie, ed ognuna di queste può rispondere alle forze, aprendo (*unfolding*) parte della sua struttura per rivelare un sito di legame nascosto che invia un segnale. Nello stato di riposo, la cellula è attaccata ad una proteina della ECM, ad esempio la fibronectina, mediante legame ad una proteina transmembrana, ad esempio una integrina, che a sua volta è legata tramite il suo dominio intracellulare al citoscheletro (ad esempio con legami ad una F-actina mediata da α -actina o da talina). Quando una proteina della matrice extracellulare è soggetta ad una sollecitazione meccanica, si verifica la transizione di una delle tre proteine, che a sua volta attiva la cellula. La prima condizione possibile prevede che un dominio della proteina extracellulare si apra esponendo un sito nascosto, che agisce come ligando di attivazione per i recettori vicini. La fibronectina, così come altre proteine extracellulari con domini omologhi, apre specifici moduli sotto sollecitazioni di poche decine di piconewton applicate mediante microscopio a forza atomica, per rivelare siti nascosti che promuovono l'assemblaggio delle fibrille della fibronectina, essenziali per l'appropriata attivazione delle integrine (Jiang *et al.* 2003). La seconda possibilità è data dalla

trasmissione della forza da parte delle proteine extracellulari alla proteina transmembrana, che incorre così in un cambiamento conformazionale di attivazione. La terza condizione possibile prevede che le proteine extracellulari e transmembrana rimangano invariate, ma trasmettano la forza ad una proteina legata ad un recettore. Alternativamente a queste tre tipologie di transizione proteica, la forza potrebbe essere trasmessa attraverso regioni più decentralizzate del citoscheletro ad una parte più distante della cellula.

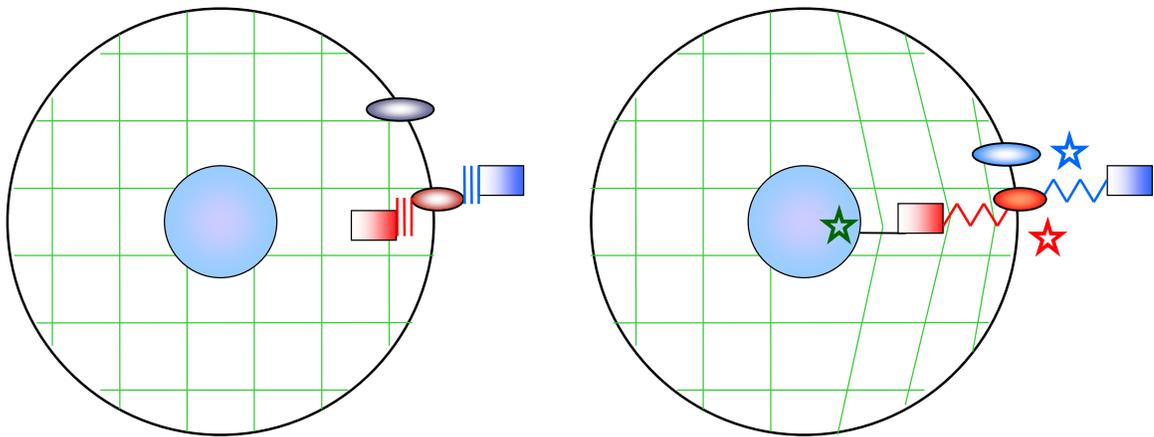


Fig. 1.6. Meccanotrasduzione all'interfaccia membrana - citoscheletro

Anche il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare ha almeno due, probabilmente in relazione, meccanismi di risposta alle sollecitazioni meccaniche (Janmey and Weitz, 2004). La natura anfipatica dei fosfolipidi genera nella membrana due forze laterali in opposte direzioni. Una forza, che tende ad aumentare l'area della membrana, è dovuta all'entropia configurazionale raggiunta quando le catene idrofobiche si dispongono casualmente nella loro conformazione. Questo guadagno in entropia deriva dal fatto che in soluzione acquosa le catene idrofobiche del doppio strato lipidico sono molto più diritte di quanto non lo sarebbero se si trovassero in catene pure oppure in solventi idrofobici. In opposizione a questa, è presente una forza dovuta al costo di energia libera associato all'esposizione all'acqua di catene idrofobiche all'interfaccia della membrana. Le proteine transmembrana inserite nel doppio strato si trovano in equilibrio meccanico con queste forze, che dipendono fortemente dalla natura delle catene lipidiche e dalla curvatura della membrana. Quando la membrana è deformata da

una sollecitazione, possono accadere due cose: innanzitutto, il cambiamento delle forze laterali presenti nel doppio strato lipidico può generare un cambiamento nella conformazione di una proteina transmembrana, portando così alla sua attivazione (Colombo *et al.*, 2003). Dal momento che la membrana contiene differenti tipologie di lipidi, la seconda situazione che si può manifestare quando la membrana cellulare è sottoposta a sollecitazioni sia dall'esterno sia da connessioni al citoscheletro, è un'alta locale curvatura in grado di riorganizzare chimicamente la membrana, dal momento che i lipidi sono più stabili se diffondono in membrane curve piuttosto che in membrane piatte (Brumm *et al.* 1996).

Bibliografia

1. Alcaraz, J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepas X, Fabry B, Farre R, Navajas D (2003). Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **84** (3), 2071–2079.
2. Bao G and Suresh S (2003). Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature materials*, **2** 715-725.
3. Brumm, T *et al.* (1996) The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biophys. J.* **70**, 1373–1379.
4. Colombo, G *et al.* (2003) Simulation of MscL gating in a bilayer under stress. *Biophys. J.* **84**, 2331–2337.
5. Coughlin, MF, Stamenovic D (2003). A prestressed cable network model of the adherent cell cytoskeleton. *Biophysical Journal* **84** (2), 1328–1336.
6. Dong, C, Skalak R, Sung KL (1991). Cytoplasmic rheology of passive neutrophils. *Biorheology* **28** (6), 557–567.

7. Dong, C, Skalak R, Sung KL, Schmid-Schonbein GW, Chien S (1988). Passive deformation analysis of human leukocytes. *Journal of Biomechanical Engineering* **110** (1), 27–36.
8. Evans, E and Yeung A (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys. J.* **56**, 151-160
9. Evans, EA, and DA Calderwood (2007). Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion. *Science*, 25 may, vol 316.
10. Fabry, B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Fredberg J J (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters* **87** (14), 148102.
11. Fabry, B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Taback NA, Millet EJ, Fredberg JJ (2003). Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E* **68** (4), 041914.
12. Fuller, B (1961). Tensegrity. *Portfolio Artnews Annual* **4**, 112-127.
13. Fung, YC (2006). Biomechanics: mechanical properties of living tissues. New York: Springer-Verlag.
14. Fung, YC (1965). Foundations of Solid Mechanics. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ.
15. Fung, YC (1993). Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues. 2nd ed. Springer, New York.
16. Heuser, J and MW Kirschner (1908). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell. Biol.* **86**, 212-234
17. Hooke, R (1665). Micrographia
18. Hochmuth, RM, Ting-Beall HP, Beaty BB, Needham D, Tran-Son-Tay R (1993). Viscosity of passive human neutrophils undergoing small deformations. *Biophysical Journal* **64** (5), 1596–1601.
19. Ingberg, DE (1993). The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering? *Cell* **75**, 1249-1252
20. Ingberg, DE (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science* **116**, 1157-1173

21. Ingber, DE (2006) Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB Journal*, **20**, 811-827
22. Janmey, PA and Weitz DA (2004) Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 7, 364-370
23. Jiang, G *et al.* (2003) Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* **424**, 334–337
24. Lim, CT, EH Zhou, ST Quek (2006). Mechanical models for living cells-a review. *Journal of Biomechanics*, **39** 195-216
25. Maniotis, AJ *et al.* (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 849–854
26. Munevar, S *et al.* (2004) Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺ entry. *J. Cell Sci.* **117**, 85–92
27. Pritz, T (1996). Analysis of four-parameter fractional derivative model of real solid materials. *Journal of Sound and Vibration* **195** (1), 103–115.
28. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS and Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* **75**: 977–984.
29. Satcher Jr., RL, Dewey Jr. CF (1996). Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton. *Biophysical Journal* **71** (1), 109–118.
30. Schmid-Schonbein, GW, Sung KL, Tozeren H, Skalak R, Chien S (1981). Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophysical Journal* **36** (1), 243–256.
31. Snelson, K (1996). Snelson on the tensegrity invention. *Int. J. Space Struct.* **11**, 43-48.
32. Stamenovic, D and DE Ingber (2002). Models of cytoskeletal mechanics and adherent cells. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **1**, 95-108.
33. Stamenovic, D, Fredberg JJ, Wang N, Butler JP, Ingber DE (1996). A microstructural approach to cytoskeletal mechanics based on tensegrity. *Journal of Theoretical Biology* **181** (2), 125–136.

34. Sussman, MA, McCulloch A and Borg TK (2002). Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* **91**: 888–898.
35. Tavi P, Laine M, Weckstrom M and Ruskoaho H (2001). Cardiac mechanotransduction: from sensing to disease and treatment. *Trends Pharmacol Sci.* **22**: 254–260.
36. Tsai, MA, Frank RS, Waugh RE (1993). Passive mechanical behaviour of human neutrophils: power-law fluid. *Biophysical Journal* **65** (5), 2078–2088.
37. Yeung, A and Evans E (1989). Cortical shell–liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical Journal* **56** (1), 139–149.
38. Zhelev, DV, Needham D, Hochmuth RM (1994). Role of the membrane cortex in neutrophil deformation in small pipets. *Biophysical Journal* **67** (2), 696–705.

Capitolo 2.

Tecniche per lo studio della meccanica cellulare

Imagination is more important than knowledge

Albert Einstein

Quella che segue è una revisione della letteratura sulle tecniche attualmente impiegate per la manipolazione e stimolazione delle cellule viventi. In un recente articolo, Bao e Sures (2003) hanno classificato tali tecniche in tre categorie principali: deformazione locale di una porzione della cellula mediante sonde; stimolazione meccanica dell'intera cellula; stimolazione meccanica simultanea di un'intera popolazione di cellule. Alla prima categoria appartengono le tecniche di microscopia a forza atomica e la citometria torsionale mediante sferette magnetiche (*magnetic twisting cytometry*); l'aspirazione mediante micropipette e le pinzette ottiche (*optical tweezers*) ricadono nella seconda categoria, mentre nella terza si possono includere i dispositivi di *stretching* a base di membrane e l'applicazione di stress di taglio generati da flussi indotti. Le stesse tecniche di manipolazione e stimolazione si possono classificare altrimenti in due ampie categorie (Moraes *et al.*, 2006): caratterizzazione passiva e stimolazione attiva di cellule. Le tecniche di caratterizzazione passiva vengono impiegate per determinare le proprietà meccaniche della struttura cellulare mentre la stimolazione attiva prevede l'applicazione di forze meccaniche e l'analisi della risposta biologica della cellula. Le tecniche di caratterizzazione passiva includono l'aspirazione con micropipette, la microscopia a

forza atomica, le pinzette ottiche e la sperimentazione mediante sferette magnetiche. La stimolazione attiva di cellule può essere eseguita mediante dispositivi di *stretching*, mediante flussi indotti e mediante substrati che possono variare la loro rigidità. Si analizzano di seguito le tecniche principali ed i risultati finora ottenuti.

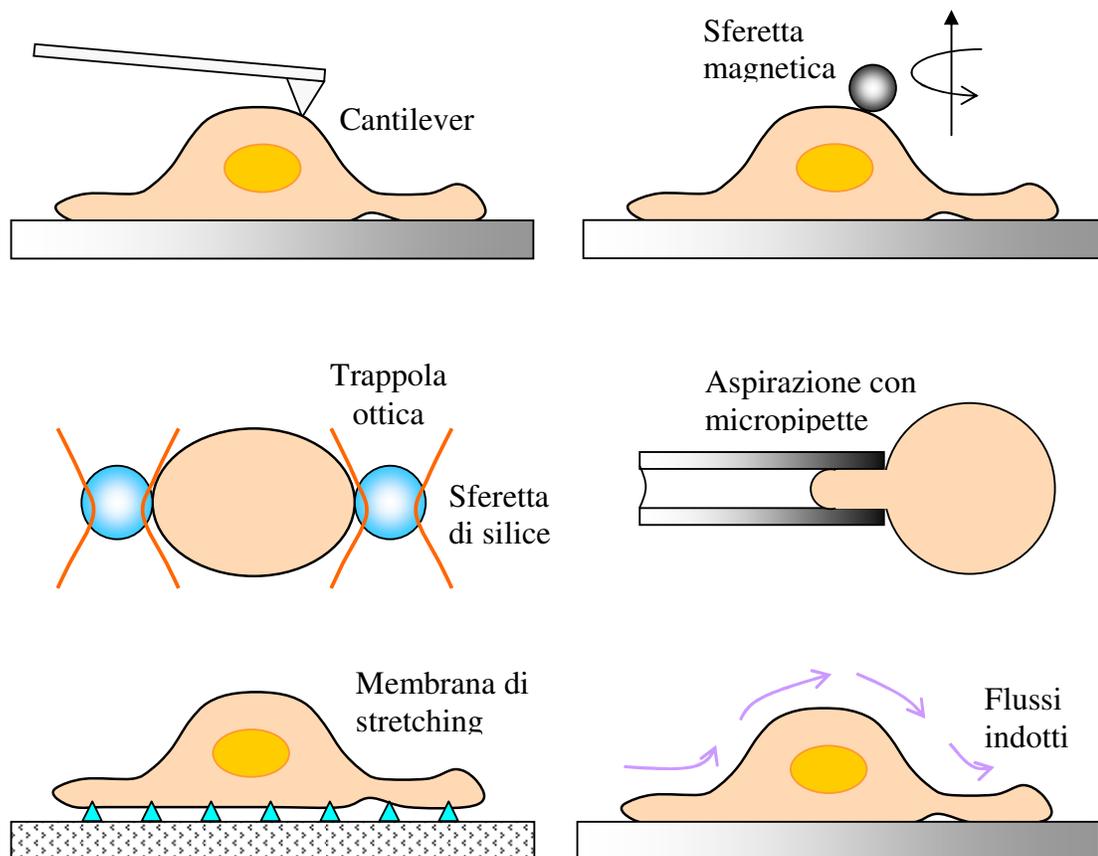


Fig. 2.1. Tecniche di manipolazione e stimolazione di cellule viventi

2.1 Tecniche per la deformazione locale di una singola cellula

2.1.1 Microscopio a Forza Atomica

Il Microscopio a Forza Atomica ha visto la sua introduzione nel mondo scientifico nel 1986 ad opera di Binnig, Quate e Gerber (Binnig *et al.*, 1986). L'AFM utilizza un

cantilever -una leva di dimensioni micrometriche: lunghezza nell'ordine del centinaio di micron, larghezza nell'ordine della decina di micron e spessore nell'ordine dei micron- dotato di una *tip* appuntita con un raggio di curvatura variabile fra i 5 e i 50 nm, come *probe*, o sonda, per la valutazione dell'interazione fra la *tip* stessa e la superficie del campione in termini di forza. Nella sua configurazione tipica il cantilever, microfabbricato in silicio o nitruro di silicio, è fissato ad un attuatore piezoelettrico che regola il movimento del campione consentendo la scansione della *tip* sulla sua superficie (fig. 2.2). L'intensità delle interazioni tra la punta e gli atomi superficiali del campione, risultano in una deflessione proporzionale della leva dipendente a sua volta dalla distanza. L'angolo di deflessione della leva, misurato tramite lo spostamento di un fascio laser riflesso sul dorso della sua estremità libera, permette di risalire alla struttura superficiale del campione: lo spot luminoso del fascio termina su un elemento di rivelazione fotosensibile costituito da un fotodiodo a quadranti che trasforma il segnale luminoso in un segnale elettrico (Scuor, 2004).

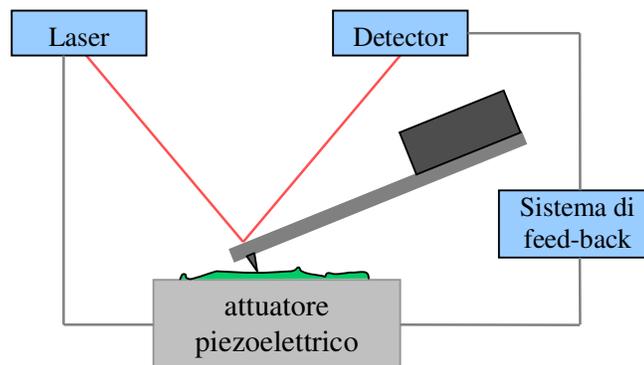


Fig. 2.2. Principio di funzionamento di un Microscopio a Forza Atomica

Il segnale prodotto dal sensore viene quindi utilizzato per costruire un'immagine tridimensionale (x,y,z) del campione analizzato.

L'AFM può operare in diverse modalità: quelle tradizionalmente impiegate nella microscopia a sonda sono il *contact mode*, *non-contact mode* e *tapping mode*; nelle suddette modalità, il microscopio a forza atomica è impiegato per effettuare mappature di superfici, misure metrologiche superficiali ed *imaging*. L'AFM può anche fornire informazioni strutturali sulle cellule se impiegato in modalità forza-distanza: dopo aver effettuato una scansione della cellula secondo una delle tre modalità sopra elencate, il

cantilever viene posizionato sopra la zona che si vuole sollecitare e tramite una scansione in z viene spinto contro la superficie del campione. Andando a misurare la deflessione del cantilever mediante il laser riflesso, è possibile calcolare, nota la costante elastica della leva impiegata, la forza agente sulla punta (Scheffer *et al.*, 2001).

La tecnica AFM produce tipicamente delle stime della rigidità della cellula piuttosto elevate rispetto ai valori ottenuti con le altre tecniche (centinaia di kiloPascal, contro la maggior parte delle altre tecniche che danno risultati che si aggirano intorno agli 0.1-10 kPa); tale tecnica, tuttavia, è probabilmente la migliore per dimostrare l'eterogeneità della cellula. L'AFM è particolarmente utile per mappare le differenti zone della cellula –per evidenziare ad esempio la distribuzione delle fibre di actina- dal momento che consente la scelta della collocazione dell'indentazione. L'AFM può essere utilizzato in aria o in ambiente liquido (Dufrene *et al.*, 2001). La punta può assumere diverse configurazioni o funzionalizzazioni a seconda della tipologia di prova. Si utilizza, ad esempio, un cantilever *V-shaped* con attaccata all'estremità un sfera di silice (Berdyeva *et al.*, 2005) oppure di polistirene (Hyoncol *et al.*, 2002), in maniera da garantire una maggiore area di contatto rispetto ad una tipica sonda commerciale (il cui raggio di curvatura varia nel range dei 5-50 nm). Il maggiore contatto fra tip e cellula consente una mediazione delle variazioni di rigidità locale, se comparate a quelle rilevate mediante l'utilizzo di una tip tradizionale, con conseguente minor variazione del Modulo di Young. Le misure effettuate mediante sferette microscopiche hanno infatti consentito di ottenere valori di Modulo di Young dell'ordine del kPa (Wojcikiewicz *et al.*, 2003). E' molto difficile inoltre effettuare esperimenti con una tip appuntita: a causa della bassa rigidità della cellula, spesso la punta penetra semplicemente all'interno di essa, mostrando rigidità molto più alte dovute al contatto con il substrato rigido. Infine, mediante l'utilizzo di sferette di dimensioni micrometriche, in fase di scansione per la prima mappatura si causa soltanto un danno minimale alla cellula, se paragonato a quello che può essere causato da una punta tradizionale.

Mediante la tecnica AFM si è potuto dimostrare come la cellula presenti essenzialmente tre aree a differente rigidezza: l'area sopra il nucleo, il citoplasma ed i bordi della cellula (Berdyeva *et al.*, 2004); che il Modulo di Young di ciascuna area è dalle 2 alle 4 volte maggiore nelle cellule vecchie (40-60 passaggi) piuttosto che in quelle giovani (10-20 passaggi) (Berdyeva *et al.*, 2005).

La possibilità di impiegare l'AFM in modalità forza-distanza, l'ha reso uno strumento molto utile anche per molti altri studi sulla biomeccanica: la tip del cantilever può essere funzionalizzata chimicamente per lo studio delle interazioni fra proteine (Merkel *et al.*, 1999), interazioni cellula-superficie (Dufrene *et al.*, 2001) e interazioni cellula substrato (Gad *et al.*, 1997).

2.1.2 Magnetic twisting cytometry

La movimentazione di sfere magnetiche all'interno della cellula o attaccate sulla sua superficie domina la letteratura relativa agli studi di viscoelasticità cellulare.

Peter Valberg è stato uno dei primi ricercatori ad utilizzare la tecnica delle sfere magnetiche per questa tipologia di studi (Valberg and Felman, 1987; Valberg and Alberini, 1985). Egli ha testato macrofagi provenienti da criceti, precedentemente sottoposti a respirazione di particelle di ossido di ferro, movimentando tali particelle mediante campo magnetico esterno. Il gruppo ha così potuto stimare l'apparente viscosità intracellulare pari a $1.2-2.7 \times 10^3$ Pa·s. Lo stesso gruppo ha utilizzato la tecnica anche per testare altre tipologie di cellule e materiali come componenti citoplasmatici purificati e gel di filamenti di actina (Zaner and Valberg, 1989). Il valore medio di viscoelasticità riscontrato per la singola cellula era nel range degli 0.45 Pa·s.

Gli studi appena citati hanno fatto sì che le sfere venissero fagocitate dalle cellule. Altre tecniche invece prevedono una funzionalizzazione delle sfere affinché queste si attacchino alla superficie della membrana cellulare. Il primo studio focalizzato sull'analisi della locale viscoelasticità di cellule aderenti è riportato da Bausch *et al.* (1998). Il microreometro per le sfere magnetiche da loro impiegato consente la generazione di forze fino a 10^4 pN. Le sfere sono state funzionalizzate con fibronectina in modo da aderire alle integrine sulla superficie della membrana dei fibroblasti. Essi hanno così potuto osservare tre parametri: modulo elastico a taglio, rilassamento ed effettiva viscosità. Quest'ultima si è potuta valutare intorno ai 4×10^3 Pa·s, in buon accordo quindi con i risultati ottenuti da Sato *et al.*, 1984 e da Valberg.

2.2 Tecniche per la deformazione di un'intera cellula

2.2.1 Aspirazione con micropipette

Una delle prime tecniche utilizzate per la deformazione di un'intera cellula allo scopo di studiarne le proprietà meccaniche è l'aspirazione tramite micropipette. La tecnica prevede l'uso di una micropipetta appuntita e di un manometro per il monitoraggio della pressione all'interno della micropipetta stessa. La punta viene collocata per mezzo di un micromanipolatore in prossimità di una cellula sospesa in soluzione salina. Una porzione della cellula viene fatta poi convogliare all'interno della punta della micropipetta mediante l'applicazione di una pressione (Hochmuth, 1990; Hochmuth, 1993); l'ulteriore pressione causa l'ingresso dell'intera cellula nella pipetta analogamente al comportamento di un fluido (Evans and Yeung, 1989). Infine, la cellula si porta in una nuova posizione di equilibrio nella pipetta con un comportamento simil solido (Theret *et al.*, 1988). La variabile indipendente fondamentale in questi esperimenti è la pressione di suzione. La risposta può essere o dell'intera cellula o di una porzione di questa.

E' inoltre possibile monitorare la velocità alla quale la cellula fluisce nella punta della pipetta. Da questa tipologia di misure, si è potuto ottenere una stima del valore di viscosità per il citoplasma. Needham e Hochmuth (1990) hanno ottenuto per la viscosità del citoplasma di neutrofili, eseguendo prove a temperatura ambiente, un valore pari a 135 Pa·s. Evans e Yeung (1989), eseguendo le stesse misure utilizzando una pipetta di dimensioni inferiori, hanno ottenuto un valore pari a 200 Pa·s. L'aspirazione con micropipette può essere impiegata anche per la misura della forza di adesione che lega una cellula ad un determinato substrato, andando a misurare la pressione di suzione necessaria per giungere al distacco della cellula (Francis *et al.*, 1987). La tecnica è stata inoltre utilizzata per lo studio delle proprietà viscoelastiche di cellule endoteliali (Sato *et al.*, 1990).

2.2.2 Optical tweezers

Anche le pinzette ottiche (*optical tweezers*) possono essere impiegate per la deformazione meccanica dell'intera cellula (Gourley, 2005; Dao *et al.*, 2003). Il termine deriva dal fatto che una sferetta di materiale dielettrico con un alto indice di rifrazione viene letteralmente intrappolata mediante un fascio laser, tipicamente infrarosso. Quando

i fotoni passano attraverso un oggetto dielettrico ad alto indice di rifrazione – generalmente si impiegano sfere di silice-, questi sono soggetti ad un cambiamento di momento che si traduce in forza esercitata sull'oggetto stesso che lo spinge verso il punto focale del fascio laser. Le forze generabili mediante le *optical tweezers* sono tipicamente dell'ordine dei piconewton. Le sfere possono essere funzionalizzate (con fibronectina ad esempio) o meno (legame aspecifico) per poi essere messe a contatto con la cellula: dall'analisi della forza applicata e delle risultanti deformazioni si possono ricavare le informazioni sulle proprietà meccaniche della cellula. Questa tecnica è stata impiegata per la prima volta da Ashkin *et al.* (1987) per la manipolazione di singole cellule; può essere attuata solamente su cellule in sospensione, tipicamente globuli rossi (Lenormand *et al.*, 2001). L'applicazione di sollecitazioni a trazione su globuli rossi umani mediante *optical tweezers* al fine di misurare le proprietà elastiche della cellula è stata riportata per la prima volta da Henon *et al.* (1999). L'analisi delle deformazioni per l'estrapolazione delle proprietà meccaniche ha richiesto poi rigide assunzioni sulla forma della cellula, idealizzando, ad esempio, la cellula biconcava come un disco planare bidimensionale e trascurando gli effetti della regione di contatto tra la cellula e le sfere. Sleep *et al.* (1999) hanno stimato le proprietà elastiche dei globuli rossi utilizzando due sfere di polistirene di diametro 1 micron intrappolate mediante laser Nd:YLF con lunghezza d'onda pari a 1.047 μm . In questi studi, una sfera veniva mantenuta fissa, l'altra mossa mediante trappola ottica inducendo una deformazione per trazione nella cellula, esercitando una forza massima di 20 pN. Tra gli studi più interessanti realizzati mediante *optical tweezers* vi sono sperimentazioni compiute su cellule infette da malaria: la struttura del citoplasma dei globuli rossi, la forma di questi e la costituzione molecolare della membrana è alterata durante la maturazione del parassita *Plasmodium Falciparum* così che la cellula perde progressivamente la capacità di essere sottoposta a larghe deformazioni (Lim *et al.*, 2003).

Gli studi iniziali mediante *optical tweezers* sono stati condotti analizzando le iniziali piccole deformazioni elastiche di cellule con basse forze applicate.

Per giungere alle grandi deformazioni, sono state inevitabilmente richieste forze maggiori. Uno studio sull'*unfolding* biomolecolare eseguito da Kellermayer *et al.* (1998) riporta una stima della forza di trazione applicata pari a 400 pN, ottenuta mediante *optical tweezers* con laser Nd:YAG di lunghezza d'onda 1046 nm e potenza massima di 1.5 W, impiegato per intrappolare sfere di latex di 3 micron di diametro. La possibilità

di indurre larghe deformazioni elastiche nei globuli rossi è stata recentemente dimostrata (Dao *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004). La forza applicata è stata di circa 193 ± 20 pN ottenendo come risultato una deformazione del 100% della cellula.

2.2.3 *Microplates*

Nel 1999 è stato introdotto un nuovo microdispositivo per la manipolazione e la perturbazione meccanica della singola cellula sotto microscopio ottico (Thoumine *et al.*, 1999). Lo strumento, denominato *microplates*, è costituito da due barre rettangolari di vetro con punta piatta, tipicamente di 2 μm di spessore e 20 μm di larghezza, la cui specifica forma e rigidità può essere opportunamente modificata variando il protocollo di *pulling*. Dopo appropriato trattamento chimico, i *microplates* sono pronti per accogliere la cellula. Per sostenere la cellula viene utilizzato un micropiattino rigido; un micropiattino più flessibile è invece impiegato come sensore di stress, consentendo di esercitare forze nel range 1-1000 nN. Il principale vantaggio dei *microplates* risiede nella loro semplicità geometrica e proprietà superficiali. In una iniziale versione del dispositivo, sia la deformazione della cellula sia la deflessione del micropiattino flessibile venivano rilevate mediante microscopio ottico in campo chiaro. In un upgrade successivo, la deflessione del *microplate* veniva invece rilevata tramite riflessione di un raggio laser ad un fotodiodo (Fernandez, 2006). Sono state condotte prove di compressione, trazione e di distacco dal substrato. I risultati ottenuti hanno evidenziato la possibilità di distinguere tre regimi meccanici sulla base di una scala temporale: elastico (predominante a piccoli tempi, ad esempio nell'ordine dei secondi), viscoso (caratteristico rilassamento dopo circa un minuto) e contrattile (apparentemente su scale di tempo maggiori, 10 minuti - 1 ora). Gli esperimenti sono stati interpretati con un modello viscoelastico di Kelvin (un pistone ed una molla in serie, in parallelo con una molla) comprendente elementi a tensione, rappresentato dalla contrazione dipendente dall'actina. È stato poi possibile quantificare diversi parametri: il modulo elastico di fibroblasti, pari a circa 1000 Pa, un'apparente viscosità di 104 Pa·s ed una forza contrattile caratteristica di circa $4 \cdot 10^{-8}$ N.

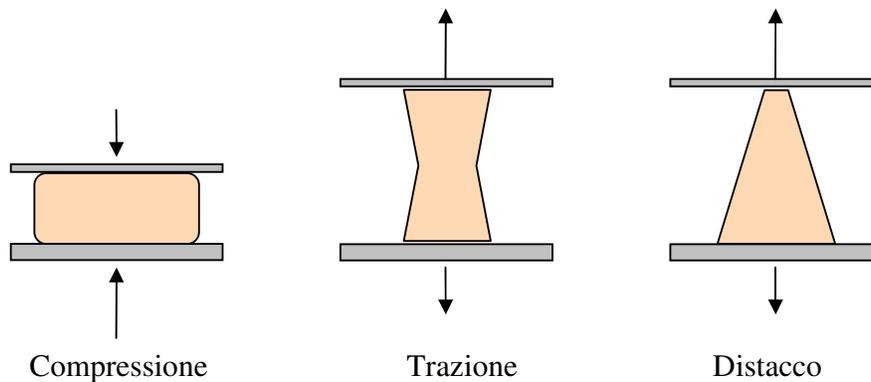


Fig. 2.3. Microplates

2.3 Tecniche per la deformazione di un'intera popolazione di cellule

2.3.1 Dispositivi di stretching a base di membrane

L'applicazione di una prefissata deformazione ad un'intera popolazione di cellule si ottiene generalmente coltivando le cellule su substrati elastici (tipicamente elastomeri siliconici) ed applicando una deformazione nota al substrato. Il ricoprimento del substrato può essere modificato a seconda delle caratteristiche di adesione delle cellule; tuttavia sono stati quasi esclusivamente utilizzati fibronectina e collagene. Le frequenze di deformazione variano tipicamente fra 0.1 e 10 Hz, mentre le percentuali di deformazione variano fra l'1% ed il 30%. Lo stretching 1D è basato sul tensionamento della membrana in una direzione: alcuni dispositivi consentono la deformazione libera della membrana nella direzione perpendicolare all'allungamento, altri costringono i due bordi liberi in maniera tale che non vi sia compressione come risultato dello stretching della membrana. I dispositivi 2D sono un'estensione degli 1D e consentono una deformazione nelle due direzioni del piano, garantendo un più uniforme campo biassiale di deformazioni (Huang *et al.*, 2004). Le due principali tipologie di dispositivi per la deformazione biassiale sono costituiti rispettivamente da un dispositivo a pistone ed uno a pressione. Nel primo caso, un pistone si muove nella direzione ortogonale alla membrana. Il dispositivo consente al pistone di scorrere rispetto alla membrana fissa, affinché questo possa indurre una deformazione della membrana. Nel dispositivo a pressione, la membrana è sigillata:

introducendo ed espellendo un gas dalla parte sottostante, si ottiene un cambiamento delle pressione transmembrana e la sua conseguente deformazione. Questi dispositivi possono essere progettati in maniera tale che la deformazione sia trasmessa alla cellula pressoché identicamente in tutte e direzioni e sia così indipendente dall'orientazione iniziale della cellula. La deformazione potrà variare solamente in prossimità dei bordi della membrana, dove la membrana è fissata, ma generalmente solo poche cellule crescono in prossimità dei bordi.

I dispositivi per lo *stretching* biassiale si adattano particolarmente alle molte tipologie di tecniche biochimiche e molecolari che forniscono una lettura mediata su milioni di cellule. Ad esempio, la deformazione di cellule muscolari, studi di attivazione di MAP chinasi, studi di dipendenza dell'attivazione dal tipo di matrice usata per ricoprire la membrana, etc (Reusch *et al.*, 1997). E' inoltre importante sottolineare che la deformazione della cellula impone necessariamente uno stress fluido di taglio al monolayer cellulare dovuto ai flussi indotti nel mezzo al di sopra della cellula; questi stress di taglio possono risultare complessi e difficili da prevedere (Brown *et al.*, 1998).

2.3.2 Applicazione di stress di taglio generati da flussi indotti

Generalmente impiegata nello studio di cellule endoteliali, la tecnica prevede l'applicazione di stress di taglio ad un monolayer cellulare mediante la movimentazione di un fluido attraverso una camera di flussaggio. Vi sono due principali tipologie di design: una camera a flusso indotto da pressione, che tipicamente risulta in un flusso laminare con profilo completamente parabolico, ed una camera a flusso cono-piatto, nella quale un cono è ruotato relativamente ad un piatto fisso, che risulta in un flusso a profilo lineare e stress di taglio uniforme (Huang *et al.*, 2004). Vi sono molte varianti di ciascuna delle due tecniche: ad esempio, la camera a flusso indotto da pressione può avere una cross-section rettangolare o circolare. Il flusso può essere stazionario o non stazionario, in modo da generare, in questo secondo caso, uno stress di taglio variabile nel tempo. Gli ideatori dei dispositivi hanno anche previsto all'interno della camera delle alterazioni ed ostacoli geometrici per simulare regioni a flusso disturbato, come avviene in prossimità delle biforcazioni arteriose. Generalmente il livello di stress generato da flussi indotti per lo studio di cellule endoteliali varia fra 0.1 e 2 Pa. Le sequenze di segnali indotti da stress di taglio e i cambiamenti nella morfologia delle cellule endoteliali sono stati ampiamente analizzati in letteratura (Davies *et al.*, 1997). Stress di taglio possono indurre

cambiamenti nella proliferazione di cellule endoteliali, nella fluidità della membrana e nella morfologia delle cellule stesse (Ookawa *et al.*, 1993).

2.4 Altre tecniche di studio della meccanica cellulare

2.4.1 Microneedles

Tane *et al.* (2002) hanno introdotto una nuova tecnica per la manipolazione e misura delle interazioni meccaniche fra cellule ed il sottostante substrato utilizzando degli array microfabbricati di materiale elastomerico come sostegno. Gli array sono stati realizzati mediante replica-molding in polidimetilsilossano (PDMS) su di uno stampo in SU-8; gli aghi avevano un diametro di 3 μm , altezza 11 μm e spaziatura 6 μm . Dopo lavaggio, le punte degli aghi sono state funzionalizzate con fibronectina oppure collagene, per poi accogliere il materiale biologico. Le cellule sono così andate ad aderire ed appiattirsi sul substrato, flettendo i micro-agoi come fossero delle travi verticali. Per piccole deflessioni, gli aghi si comportano come semplici molle cosicché la deflessione è direttamente proporzionale alla forza applicata dalla cellula attaccata.

Controllando la geometria del micro-ago, è possibile variare la cedevolezza del substrato mantenendo costanti le proprietà superficiale. La deflessione degli aghi avviene indipendentemente da quella degli aghi vicini e quindi riporta direttamente la distribuzione subcellulare delle forze di trazione. Il gruppo del Johns Hopkins di Baltimora ha così potuto misurare le forze contrattili in cellule muscolari e fibroblasti in diverse condizioni ambientali: il valore medio della tensione innata si aggira fra gli 8 e i 40 nN.

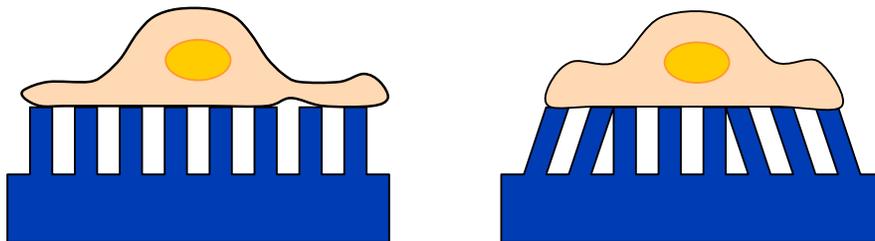


Fig. 2.4. Microneedles

2.4.2 Sistemi Micro Elettro Meccanici

Le cellule possono avere dimensioni molto diverse: un uovo d'ostrica è una singola cellula che può raggiungere un diametro di 12 cm, mentre un globulo rosso umano ha dimensioni di qualche ordine di grandezza inferiori, con un diametro approssimativo di 8 μm . La maggior parte delle cellule ha dimensioni nel range 10-30 μm , dimensioni che ben si prestano allo studio mediante dispositivi MEMS. Come enunciato ai paragrafi precedenti, le forze negli studi di biomeccanica cellulare variano fra valori di pN, come nel caso degli *optical tweezers*, e mN, come per i dispositivi di stretching a base di membrane. Queste forze si possono ottenere mediante microattuatori MEMS e rilevare mediante sensori MEMS. In molti casi, inoltre, la miniaturizzazione dei sistemi consente una riduzione dei reagenti utilizzati, consente l'applicazione di forze estremamente piccole e precise, aumenta il numero di risultati possibili per esperimento ed il numero di esperimenti effettuabili simultaneamente.

I MEMS e i sistemi microfluidici si sono già creati una nicchia nella comunità biologica. Chin *et al.* (2004) hanno sviluppato un dispositivo microfabbricato per lo studio di cellule staminali, che consente analisi quantitative su un largo numero di campioni con circa 10000 pozzetti disposti su di un vetrino coprioggetto. Leyrat *et al.* (2006) hanno sviluppato un sistema di analisi microfluidica per eseguire 100 esperimenti in un singolo chip, che può opportunamente variare la densità cellulare rilasciata, il tipo di proteina adesiva, la composizione del medium e gli intervalli di sostituzione del medium. I microdispositivi per la meccano-biologia sono meno popolari, ma hanno ricevuto comunque un degno interesse. Attualmente, la maggior parte delle piattaforme sono disegnate come tool di caratterizzazione passiva con qualche sporadico caso di dispositivi in grado di effettuare stimolazione meccanica su cellule. Alla prima classe appartengono dispositivi costituiti da sottili membrane microfabbricate, che si flettono sotto l'azione delle forze sviluppate dalle cellule: per l'analisi della deformazione sono stati sviluppati diversi algoritmi, consentendo così la valutazione della forza esercitata da ciascuna cellula. Uno dei principali svantaggi è dato dal fatto che non si possono studiare cellule su substrati troppo rigidi dal momento che le membrane dovrebbero avere una rigidità locale sufficientemente bassa da flettersi. Questo vantaggio è stato recentemente risolto da Lockwood e Palacek (2006) con il loro sistema di colture cellulari a cristalli-liquidi. Essi hanno creato una griglia microfabbricata, nella quale sono stati depositati i cristalli liquidi, gli stessi materiali impiegati per i monitor degli schermi piatti, in grado di

cambiare colore sotto azione di una forza. L'intera superficie è stata ricoperta da un sottile strato di proteine. Il sistema fornisce una regione sufficientemente rigida sulla quale le cellule possano crescere fornendo il riscontro sulle forze cellulari coinvolte. Galbraith *et al.* (1997) hanno disegnato una nuova tipologia di microdispositivo in cui sono montati dei cantilever orizzontali mobili. Le cellule sono state distribuite sui cantilever, registrando la deflessione di quest'ultimi alla migrazione delle cellule. Il limite di questo dispositivo è la possibilità di registrare forze lungo un singolo asse.

Per quanto riguarda la stimolazione attiva di cellule su microscala, la prima tecnica introdotta è stata rivolta al *micropatterning* di proteine su substrati, per poi crescere colture cellulari su queste piccole aree. Le piccole aree costringevano le cellule ad una certa tipologia di forma: esse potevano essere confinate infatti in forme geometriche innaturali come quadrati o triangoli. Ingberg (1990), inoltre, trovò che la morte e la proliferazione cellulare possono essere forzate attraverso tali vincoli geometrici, ad indicare che la meccanica gioca un ruolo importante nel comportamento cellulare. Oltre agli approcci di *micropatterning*, diversi nuovi dispositivi MEMS sono stati sviluppati per stimolare meccanicamente le cellule. Lin *et al.* (2004) hanno studiato l'effetto della tensione meccanica sulla neurogenesi della corteccia cerebrale, utilizzando un particolare microdispositivo costituito da una membrana di PDMS, sulla quale sono state coltivate le cellule, posizionata su di un apposito sistema di afferraggio con un'estremità fissa ed una mobile per l'applicazione di una sollecitazione di trazione. Essi hanno così potuto dimostrare che le deformazioni indotte modulano la migrazione neuronale, fattore chiave nello sviluppo della corteccia cerebrale.

2.5 Considerazioni riassuntive e motivazioni della scelta

La tabella 2.1 riporta riassunte le principali caratteristiche e range operativi delle tecniche impiegate per la perturbazione meccanica di una singola cellula.

Il presente lavoro di tesi, avente come scopo primo la progettazione, lo sviluppo e la sperimentazione di un dispositivo per la sollecitazione meccanica della singola cellula e la rilevazione delle conseguenti deformazioni ed alterazioni di tipo biochimico, ha richiesto come primo step la scelta fra una delle tecniche sovradescritte, oppure eventualmente l'introduzione di un nuovo sistema sperimentale. La scelta è ricaduta nei dispositivi Micro Elettro Meccanici, dal momento che essi presentano i seguenti vantaggi:

- possibilità di lavorare in ambiente liquido;
- dimensioni microscopiche, consone alla dimensione cellulare;
- possibilità di applicare forze in un ampio range (pN- μ N), bypassando i limiti degli *optical tweezers*, costretti alle centinaia di pN;
- possibilità di studiare cellule aderenti, a differenza di tecniche come gli *optical tweezers*, l'aspirazione con micropipette ed i *microplates* applicabili solamente su cellule in sospensione;
- relativo basso costo della tecnologia: un dispositivo MEMS; realizzato mediante le tradizionali tecniche di microfabbricazione ereditate dall'industria dei circuiti integrati, costa indicativamente qualche decina di dollari;
- possibilità di effettuare studi sulla singola cellula, e non solo su popolazioni di qualche milione di cellule, come avviene per i dispositivi di *stretching* e i flussi indotti;
- possibilità di stimolare l'intera cellula, e non solamente una porzione locale di questa, come avviene nel caso della microscopia a forza atomica e della *magnetizing twisting cytometry*.

	Aspirazione con micropipette	AFM	Magnetic twisting cytometry	Microplates
<i>Cellule</i>	In sospensione	Aderenti	Aderenti	In sospensione e semi-aderenti
<i>Controllo</i>	Pressione	Deflessione cantilever	Forze di torsione	Deformazione assiale
<i>Dimensione sonda</i>	NA	Piramide di raggio < 50nm; sfera ~ μm	Sferette di diametro 0.2 - 5.5 μm	Larghezza 20 μm , lunghezza >100 μm
<i>Range di forza/pressione</i>	0.1 - 2 kPa	pN, nN	0.1-10 Pa 20 pN-10 nN	1-1000 nN
<i>Range di deformazione</i>	Dip. dimensione micropipetta	Max 10%	Max 2 μm	Max 50%
<i>Risoluzione</i>	0.2 μm , 0.1 Pa	Nm, pN	0.1 μm , 1 pN	0.12 μm , 1nN
<i>Visualizzazione</i>	Microscopio in campo chiaro	Campo chiaro, microscopio confocale	Campo chiaro, microscopio confocale	Microscopio in campo chiaro
<i>Temperatura di lavoro</i>	RT	RT e 37°C	RT	RT e 37°C

Tab. 2.1. Principali caratteristiche delle tecniche di studio di singola cellula

Bibliografia

1. Bao G and Suresh S (2003). Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature materials*, **2** 715-725.
2. Bausch, AR, Muiller W and Sackmann E (1999). Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys J* **76**:573-579.

3. Bausch, AR, Ziemann F, Boulbitch AA, Jacobson K and Sackmann E (1998). Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometry. *Biophys. J.* **75**:2038-2049.
4. Berdyeva, T K, C D Woodworth and I Sokolov (2005). Human epithelia cells increase their rigidity with ageing in vitro: direct measurements. *Phys. Med. Biol.* **50** 81-92.
5. Berdyeva T K, Woodworth C D and Sokolov I (2004) Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 102, 189-198
6. Brown TD, Bottlang M, Pedersen DR and Baner AJ (1998). Loading paradigms—intentional and unintentional—for cell culture mechanostimulus. *Am J Med Sci* **316**: 162–168.
7. Chin VI *et al.*, (2004) Microfabricated platform for studying stem cell fates, *Biotech & Bioeng.* **88**(3): 399-415.
8. Dao, M, Lim CT and Suresh S (2003). Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 51:2259-2280.
9. Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N and Barakat AI (1997). Spatial relationships in early signaling events of flowmediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 59: 527–549.
10. Dufrene, YF (2002) Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. *J. Bacteriol.* 184:5205-5213.
11. Dufrene, YF, Boonaert CJ, van der Mei HC, Busscher HJ and Rouxhet PG (2001). Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **86**:113-120.
12. Evans, E and Yeung A (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys. J.* **56**:151-160.
13. Fernandez, P, Pramod AP and Ott A (2006) A Master Relation Defines the Nonlinear Viscoelasticity of Single Fibroblasts. *Biophysical Journal* **90**; 3796-3805.

14. Francis, GW, Fisher LR, Gamble RA and Gingell D (1987). Direct measurement of cell detachment force on single cells using a new electromechanical method. *J Cell Sci* **87** (4):519-523.
15. Gad, M, A Itoh and Ikai A (1997) Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscope, *Cell Bio Int* 21:697-706.
16. Galbraith CG and MP Sheetz (1997) A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 9114-9118
17. Gourley, PL (2005). Brief overview of BioMicroNano technologies. *Biotechnology Progress* 21:2-10.
18. Henon, S, Lenormand G, Richert A, Gallet F (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* **76**, 1145-1151.
19. Hochmuth, RM (1990). Cell biomechanics: a brief overview. *J Biomech Eng* **112**:233-234.
20. Hochmuth, RM (1993). Measuring the mechanical properties of individual human blood cells. *J Biomech Eng* **115**:515-519.
21. Huang H, Kamm RD, Lee RT (2004). Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* **287**:C1-C11
22. Ingber, DE, (1990) Fibronectin Controls Capillary Endothelial Cell Growth by Modulating Cell Shape, *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3579-3583.
23. Kellermayer, MSZ, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL (1998). Complete Unfolding of the Titin Molecule under External Force. *Journal of Structural Biology* **122**, 197-205.
24. Lenormand, G, Henon S, Richert A, Simeon J and Gallet F (2001). Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton. *Biophys. J.* **81**:43-56.
25. Leyrat AA *et al.*, (2006) *Proceedings of the BMES Annual Fall Meeting*
26. Lim, CT, Lee YS, Tan K, Dao M, Suresh S (2003). Unpublished research. National University of Singapore and Massachusetts Institute of Technology.

27. Lim, CT, Dao M, Suresh S, Sow CH, Chew KT (2004). Large deformation stretching of living cells using laser traps. *Acta Materialia*, 52 1837-1845.
28. Lin, G *et al.*, (2004) *Conf. Proc. 26th IEEE EMBS*.
29. Lockwood, NA, JC Mohr, L Ji, CJ Murphy, SP Palecek, JJ de Pablo, NA Abbott (2006) Thermotropic liquid crystals as substrates for imaging the reorganization of Matrigel by human embryonic stem cells. *Adv Funct Mat* 16:5 618-624.
30. Merkel, R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K and Evans E (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**:50-53.
31. Moraes, C, Craig AS, Yu S (2006) Cell Mechanics Meets MEMS, CSME Bulletin SCGM, 15-18.
32. Needham, D and Hochmuth RM (1990). Rapid flow of passive neutrophils into a 4 microns pipet and measurement of cytoplasmic viscosity. *J Biomech Eng* 112:269-276.
33. Ookawa K, Sato M and Ohshima N (1993). Morphological changes of endothelial cells after exposure to fluid-imposed shear stress: differential responses induced by extracellular matrices. *Biorheology* 30: 131-140.
34. Reusch HP, Chan G, Ives HE and Nemenoff RA (1997). Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition. *Biochem Biophys Res Commun.* **237**: 239-244, 1997.
35. Sato, M, Theret DP, Wheeler LT, Ohshima N and Nerem RM (1990) Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. *J Biomech Eng* **112**:263-268.
36. Sheffer, L, Bitler A, Ben-Jacob E and Korenstein R (2001). Atomic force pulling: probing the local elasticity of the cell membrane. *Eur Biophys J* **30**; 83-90.
37. Scuor, N (2004) Sviluppo della tecnica e della strumentazione per microscopia a scansione ad effetto tunnel in ambiente liquido, PhD Thesis, Università degli Studi di Trieste.

38. Sleep, J, Wilson D, Simmons R and Gratzer W (1999). Elasticity of the Red Cell Membrane and Its Relation to Hemolytic Disorders: An Optical Tweezers Study. *Biophys. J.* **77**:3085-3095.
39. Theret, DP, Levesque MJ, Sato M, Nerem RM and Wheeler LT (1988). The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *J Biomech Eng* **110**:190-199.
40. Tan, JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K and Chen CS (2002). Cell lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *PNAS* **100**(4);1484-1489
41. Thoumine, O, Ott A, Cardoso O and Meister JJ (1999). Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* **39**, 47-62
42. Valberg, PA and DF Albertini (1985). Cytoplasmic motions, rheology and structure probed by a novel magnetic particle method. *J. Cell Biol.* **101**:130-140.
43. Valberg, PA and JP Butler (1987). Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques. *Biophys. J.* **52**:537-550.
44. Wojcikiewicz, EP, Xiaohui Z and Moy VT (2003). Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy (AFM). *Biol. Proced. Online* **6**(1):1-9.
45. Zaner, KS and PA Valberg (1989). Viscoelasticity of F-actin measured with magnetic microparticles. *J Cell Biol* **109**:2233-2243.

Capitolo 3.

Progettazione e realizzazione dei dispositivi MEMS

I cannot believe that God would choose to play dice with the universe

Albert Einstein

Come accennato al capitolo precedente, si è scelto di realizzare il dispositivo per la sollecitazione meccanica della singola cellula impiegando la tecnologia MEMS. La realizzazione di dispositivi MEMS può avvenire sostanzialmente secondo due modalità: realizzazione presso centri di microfabbricazione dotati di camere bianche e della strumentazione necessaria per la deposizione e fotolitografia di film sottili (ad esempio il Laboratorio Nazionale TASC sito in Area Science Park, Basovizza, Trieste [1] oppure il Centro per la ricerca scientifica e tecnologica ITC-IRST di Trento [2]); realizzazione presso microfonderie commerciali internazionali che offrono processi standardizzati, ma tuttavia abbastanza generali da potersi adattare alle richieste più svariate. La prima possibilità è certamente la più versatile, avrebbe consentito ampia gamma di scelta in fatto di materiali, spessori dei film, ... ma sarebbe risultata alquanto dispendiosa in termini economici e di tempo. La seconda possibilità, invece, nonostante presenti una sequenza fissa di deposizione dei materiali e dei loro spessori, è tuttavia piuttosto generale ed adattabile a svariate applicazioni MEMS ed è in grado di supportare molti progetti differenti su di un unico wafer, riducendo così notevolmente i costi di

fabbricazione. La scelta per la realizzazione dei dispositivi è quindi ricaduta sulla seconda opzione, dal momento che poteva garantire un processo adeguato al dispositivo da realizzare, senza richiedere esborsi economici onerosi. Il processo scelto per la fabbricazione dei dispositivi è il processo PolyMUMPs di Memscap (Bernin, Francia), che verrà descritto in dettaglio ai paragrafi seguenti. Si è scelto di presentare prima il processo di realizzazione dei dispositivi MEMS e successivamente la progettazione degli stessi, temporalmente antecedente, affinché il lettore possa meglio apprendere le scelte realizzative effettuate in fase di progettazione.

3.1 Realizzazione dei dispositivi mediante il processo PolyMUMPs

3.1.1 Il processo PolyMUMPs

I dispositivi sono stati realizzati mediante il processo PolyMUMPs di Memscap. PolyMUMPs è un processo di microfabbricazione superficiale a tre strati di polisilicio ideato e realizzato tra la fine degli anni '80 e l'inizio dei anni '90 al Berkeley Sensors and Actuators Centre presso l'Università della California. Tale processo è differente rispetto ai tradizionali sistemi di microfabbricazione perché è stato progettato in modo da essere il più generale possibile ed essere in grado di supportare molti progetti differenti su di un unico wafer. Il sistema, quindi, non è ottimizzato per un dispositivo in particolare: gli spessori degli strati strutturali e sacrificali sono stati scelti in maniera tale da soddisfare le esigenze della maggior parte degli utilizzatori (Koester *et al.*, 2003).

Il processo ha inizio da un wafer di silicio di tipo n, di spessore 100 mm. La superficie del wafer viene per prima cosa drogata pesantemente con fosforo in un tradizionale forno di diffusione utilizzando POCl_3 come fonte dopante. Per l'isolamento elettrico tra substrato e parte strutturale viene poi depositato uno strato di Si_3N_4 mediante LPCVD (*Low Pressure Chemical Vapor Deposition*). Il passo successivo consiste nella deposizione (mediante LPCVD) di un film di polisilicio dello spessore di 500 nm (che prende il nome di Poly0) che viene poi modellato mediante fotolitografia: si ricopre il wafer di uno strato di photoresist, che viene poi esposto ad un'appropriata maschera per il successivo sviluppo. Il photoresist così modellato funge da schermo per l'attacco (*etching*) del Poly0 mediante RIE (*Reactive Ion Etch*).

Le operazioni successive consistono nella deposizione mediante LPCVD di uno strato sacrificale –sacrificale in quanto alla fine del processo verrà rimosso per liberare gli strati

strutturali di polisilicio- di PSG (*phosphosilicate glass*) dello spessore di 2 μm e ricottura del wafer a 1050°C in argon per un'ora. Segue l'esposizione alle maschere per le DIMPLES (fossette) che vengono ricavate nello strato di PSG mediante RIE. La loro profondità nominale è 750 nm.

I wafer sono così pronti per essere modellati con la terza maschera, ANCHOR1, e sottoposti nuovamente a RIE. L'opzione ANCHOR1 consente la realizzazione di fori d'ancoraggio. Dopo l'attacco, tali cavità vengono riempite con la deposizione di uno strato di 2 μm di polisilicio (Poly1). Seguono un *coating* con un film di 200 nm di PSG ed una ricottura effettuata per una duplice ragione: drogaggio del polisilicio con fosforo e riduzione degli stress interni a tale strato. Il PSG viene poi attaccato in modo tale da realizzare un'*hard mask* (più resistente di quella di *photoresist*) per la successiva incisione del Poly1. La maschera di PSG viene quindi rimossa mediante RIE.

Dopo l'attacco del Poly1, un secondo strato di PSG viene depositato e ricotto. Il Secondo Ossido, come viene definito, è forgiato mediante due maschere: il livello POLY1_POLY2_VIA realizza fori nel Secondo Ossido fino al Poly1. Quest'operazione fornisce una connessione elettrica e meccanica tra gli strati Poly1 e Poly2. Il livello ANCHOR2, invece, consente l'attacco sia del Primo che del Secondo Ossido in un solo passo. Entrambi i livelli sono modellati ed incisi mediante RIE.

Dopo queste operazioni, si prosegue con la deposizione del secondo strato strutturale, il Poly2, dello spessore di 1.5 μm . Seguono la deposizione di 200 nm di PSG e gli stessi trattamenti di ricottura e di modellazione previsti per il Poly1.

L'ultima operazione consiste nella deposizione di uno strato d'oro dello spessore di 0.5 micron. L'adesione fra oro e polisilicio si realizza mediante un sottile film di Cr dello spessore di 20 nm (PolyMUMPs FAQ, 2004). La possibilità di metallizzare il MEMS viene fornita per diversi motivi: innanzitutto per la creazione delle connessioni elettriche con l'esterno; per consentire l'eventuale ancoraggio di molecole sonda o la formazione di legami; infine, per mettere a disposizione una superficie altamente riflettiva.

Il wafer viene quindi esposto all'ottava maschera ed il metallo viene forgiato mediante *lift-off*.

I wafer sono così pronti per essere tagliati, impacchettati e spediti al cliente che provvederà al necessario rilascio degli strati strutturali mediante attacco di quelli sacrificali.

In figura 3.1 viene mostrata la cross-section, realizzata con il programma L-EDIT, di una delle strutture MEMS più semplici, il cantilever; si possono osservare tutti gli strati caratteristici del processo PolyMUMPs.



Fig. 3.1. Cantilever realizzato mediante tecnica PolyMUMPs. Si notano tutti gli strati caratteristici: i tre strati strutturali di polisilicio Poly0, Poly1 e Poly2 (rispettivamente arancione, rosso e grigio), i due strati di ossido sacrificale in bianco, lo strato dielettrico di nitruro di silicio in azzurro e la metallizzazione finale d'oro in blu

3.1.2 Lo stripping ed il rilascio delle strutture

I dispositivi vengono forniti al cliente ricoperti da uno strato di fotoresist protettivo che deve essere rimosso prima del rilascio. L'eliminazione è molto semplice e si realizza mediante immersione del MEMS in acetone per 3 minuti; seguono un risciacquo in acqua distillata per 1.5 minuti ed in alcool propilico per lo stesso tempo (Yan, 2002). Tutti i bagni vengono eseguiti mantenendo la soluzione in leggera agitazione. Infine il MEMS deve essere disidratato mediante una qualsiasi operazione di asciugatura; nel presente caso è stata adottata una procedura di disidratazione in forno a 150°C per 10 minuti.

Dopo lo *stripping* del fotoresist è possibile procedere con il rilascio vero e proprio della microstruttura. La procedura standardizzata per l'esecuzione di questo processo prevede l'immersione del MEMS in HF al 49% per 2.5 minuti, lavaggio in acqua distillata per 5 minuti, immersione in alcool propilico per 2 minuti ed asciugatura in forno a 150 °C per 10 minuti. Anche in questo caso tutti i bagni vengono effettuati mantenendo il fluido in leggera agitazione.

L'immersione in alcool propilico e la successiva disidratazione ad alta temperatura sono indispensabili per evitare che si verifichi il fenomeno della *stiction*, acrisi per *static friction*, fenomeno che si verifica quando le forze di adesione superficiale superano la forza meccanica di ritorno elastico delle micro-strutture (Liu *et al.*). In generale, quando un MEMS viene rimosso da una soluzione acquosa, sulle superfici idrofiliche si può

formare un menisco liquido che è in grado di spingere la struttura verso il substrato, provocando il fenomeno della *stiction*. Affinché sia efficace, la disidratazione si realizza molto spesso mediante essiccamento del MEMS in CO₂ supercritica.

3.2 Progettazione del dispositivo

L'ideazione e la progettazione dei dispositivi sono state condotte considerando quelle che sono le principali parti costituenti una macchina universale per test meccanici, ovvero:

- un sistema di afferraggio del campione, che ne consenta un sicuro bloccaggio, evitando lo scivolamento in fase di prova;
- una traversa mobile, della quale si possano controllare la corsa e la velocità di movimentazione;
- una cella di carico che consenta la rilevazione della sollecitazione applicata istante per istante sul campione.

Tali applicazioni dovevano inoltre poter essere realizzate mediante il processo commerciale scelto per la realizzazione dei dispositivi, il processo PolyMUMPs.

Le tre principali parti funzionali della macchina per test meccanici sono state pensate su scala microscopica nel modo seguente:

- Il sistema di afferraggio della cellula è rappresentato da una piattaforma circolare divisa in due o quattro parti a seconda della tipologia di sollecitazione che si voglia esercitare sulla cellula. Dal momento che, com'è facilmente intuibile, la cellula non può essere bloccata mediante un tradizionale jig di afferraggio (comunque difficile da realizzarsi su scala microscopica), questa deve potersi ancorare al substrato mediante i propri sistemi biologici di adesione, descritti al Capitolo 1. Il substrato dovrà quindi essere opportunamente funzionalizzato con materiali biocompatibili o biomolecole tali da garantire una buona adesione della cellula, simulando il più fedelmente possibile un ambiente biologico, in modo da non alterare il comportamento biomeccanico della cellula (Tarone *et al.*, 1982). Tale fase sarà descritta in dettaglio ai paragrafi seguenti.
- La traversa mobile è invece costituita da attuatori MEMS, realizzabili in diversi modi a seconda del principio elettromeccanico scelto. La scelta è ricaduta sostanzialmente su due tipologie di motori, che sono anche i motori solitamente impiegati per l'attuazione di sistemi MEMS [3-4]: motori *comb drive* attuati per via elettrostatica e

motori termici attuati per via termica sfruttando il riscaldamento indotto per effetto Joule dal passaggio di correnti.

- La cella di carico, di più difficile realizzazione mediante le tecnologie ed i processi a disposizione, è stata in questa prima fase tralasciata per potersi dedicare alle due applicazioni sopra descritte. La determinazione della sollecitazione applicata viene fatta quindi, in questa prima fase, mediante modellizzazione a elementi finiti delle strutture, andando a determinare rigidezza e costanti elastiche dei diversi sistemi.

3.2.1 MEMS di prima generazione

La progettazione di alcuni dei MEMS definiti di prima generazione è avvenuta prima dell'inizio del presente dottorato di ricerca, ad opera dell'Ing. Nicola Scuur e del Prof. Paolo Gallina. Se ne riporta tuttavia la descrizione dal momento che questi hanno rappresentato il punto di partenza per la progettazione di MEMS successivi e la loro caratterizzazione è stata argomento del presente dottorato di ricerca.

3.2.1.1. Piattaforma per la deposizione della cellula

La piattaforma dedicata al posizionamento della cellula è stata progettata come un supporto di polisilicio di forma circolare diviso in due o quattro parti a seconda della tipologia di sollecitazione da applicare, rispettivamente di tipo uniassiale e di tipo biassiale. La realizzazione di una piattaforma per lo *stretching* biassiale (Scuur *et al.*, 2006) costituisce elemento di novità rispetto a quanto realizzato in letteratura. La possibilità di disporre di entrambe le tipologie di supporto presenta un duplice vantaggio: da un lato, è possibile monitorare e testare la cellula applicando uno stress unidirezionale, più semplice da analizzare secondo i tradizionali modelli viscoelastici; dall'altro, vi è la possibilità di confrontare il suddetto risultato con l'applicazione di uno stress di tipo biassiale, più vicino agli stimoli biologici cui è soggetta la cellula *in vivo*. Diversi studi hanno infatti riscontrato e dimostrato la riorganizzazione di actina e miosina secondo la direzione di sollecitazione (Ballestrem *et al.*, 1998) o di movimento della cellula (Yam *et al.*, 2007). Nessuno studio, tuttavia, ha verificato il comportamento del citoscheletro qualora questo sia sottoposto ad uno stimolo di tipo bidirezionale.

La figura seguente illustra le due tipologie di piattaforme.

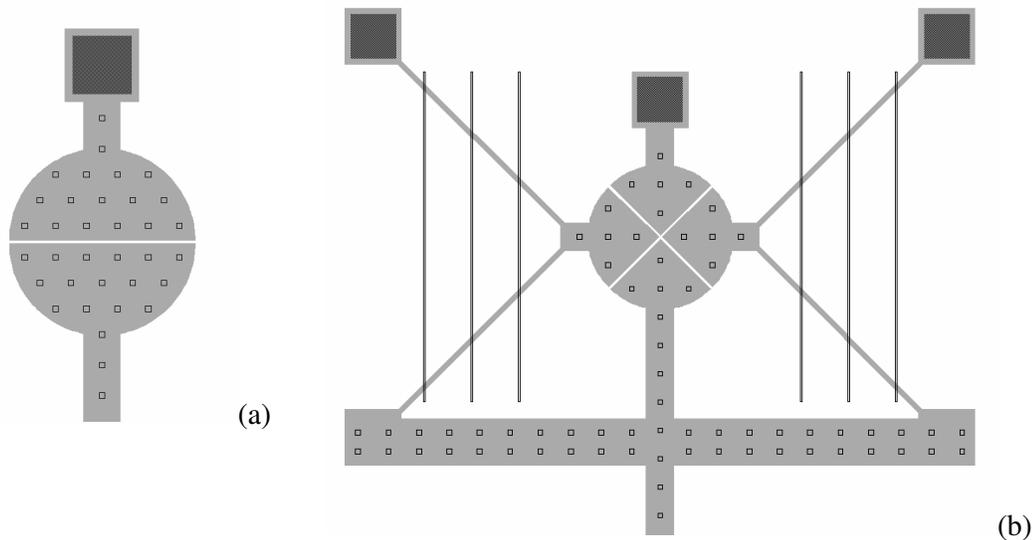


Fig. 3.2. Piattaforme di ancoraggio della cellula per l'applicazione di sollecitazioni di tipo (a) uniaxiale e (b) biassiale

Le strutture sono costituite da un doppio strato di polisilicio (POLY 1 e POLY 2), di cui tuttavia si visualizza in figura per semplicità solamente il secondo strato. La base circolare è divisa in due e quattro parti rispettivamente, delle quali una è ancorata al substrato di POLY0 (si veda la figura 3.3 dove è mostrata una cross-section verticale della piattaforma). L'ancoraggio al substrato si realizza mediante la maschera Anchor1 che consente la creazione di un'apertura della geometria e dimensioni volute nel primo ossido, senza andare ad intaccare il POLY0. In figura 3.3 si evidenzia inoltre una continuità del POLY1, laddove questo dovrebbe presentare un'apertura per consentire la movimentazione dei singoli segmenti della piattaforma. Questa semplificazione di progettazione è resa possibile grazie ad una peculiarità del processo PolyMUMPs che consente di realizzare le geometrie strutturali volute utilizzando solamente il POLY2; qualora si voglia avere una struttura di spessore 3.5 micron anziché 1.5 sarà sufficiente disegnare una maschera di POLY1 di forma rettangolare che vada a coprire tutte le parti strutturali di cui si voglia accrescere lo spessore.

I dettagli di piccole dimensioni ($6 \times 6 \mu\text{m}$), evidenziati in figura 3.2 come dei quadrati ed in figura 3.3 come dei piedini, sono delle *dimple*, ovvero fossette ricavate mediante fotolitografia nello strato di ossido prima della deposizione del POLY1 per creare su quest'ultimo dei piedini d'appoggio che garantiscano un minor attrito diminuendo la

superficie di contatto ed evitando così fenomeni di *stiction* (*static friction*). Le sei linee verticali, più precisamente dei rettangoli di 3 micron di larghezza, osservabili in Fig. 3.2 (b) rappresentano anch'esse delle dimple, realizzate più comodamente con maschere rettangolari molto lunghe anziché con quadrati di qualche micron. La spaziatura fra gli spicchi di quello che è stato definito da colleghi statunitensi *pizza-pie*, è di 2.8 micron; nel caso invece della piazzola unidirezionale, la spaziatura è di due micron, pari alla minima *feature* realizzabile mediante il processo polyMUMPs

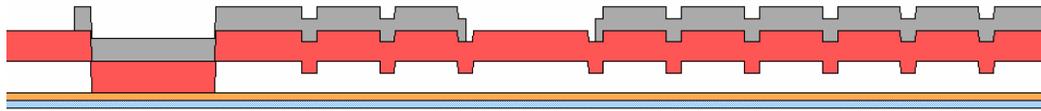


Fig. 3.3. Cross-section verticale della piattaforma evidenziata in figura 3.2 (a)

Al fine di promuovere l'adesione cellulare, è stato realizzato anche un MEMS con una piattaforma funzionalizzata con film d'oro. Come evidenziato in figura 3.4, il film ha una geometria circolare, di diametro 60 micron, ed è diviso in due parti al fine di limitare gli stress residui provocati dalla deposizione di oro sul polisilicio. Tali tensioni interne sono dovute alla differenza fra i coefficienti di dilatazione termica di oro e polisilicio, rispettivamente $14,4 \cdot 10^{-6}$ e $2,8 \cdot 10^{-6}$ $1/^\circ\text{C}$; dati forniti da Memscap [5] riportano una temperatura di deposizione dell'oro pari a 110°C , per cui lo stress residuo nel film d'oro dopo il raffreddamento può essere stimato secondo la formula seguente:

$$\sigma_{Au} = (\alpha_{Au} - \alpha_{poly}) E_{Au} \Delta T \quad (3.1)$$

Il valore dello stress residuo risulta essere pari a:

$$\sigma_{Au} = (14,4 - 2,8) \cdot 10^{-6} \cdot 78 \cdot 10^9 \cdot (110 - 25) \approx 77 \text{MPa} \quad (3.2)$$

Il corrispondente dato fornito da Memscap è pari a circa 50 MPa (con possibilità di variazione tra 0 e 100 MPa). Queste tensioni residue possono essere tali da provocare l'innalzamento di qualche micron delle estremità libere dei segmenti del *pizza-pie*, andando così ad inficiare l'adesione cellulare. Per questo motivo la zona funzionalizzata con oro è stata progettata di dimensioni di poco superiori alla massima grandezza di una

cellula (50 micron quando appiattita sul substrato) e suddivisa in due porzioni distinte su ciascun segmento di polisilicio.

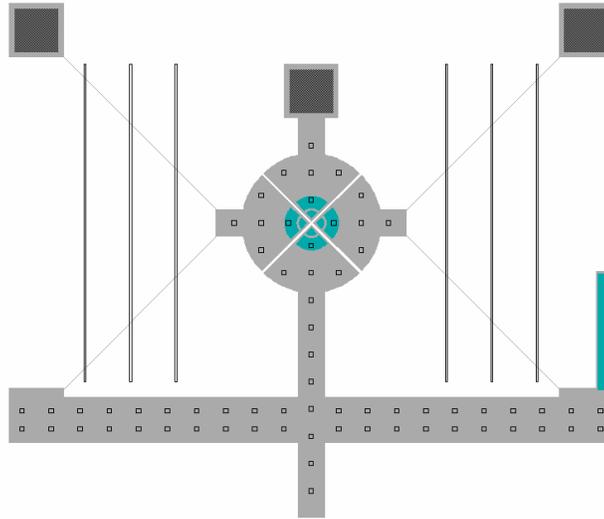


Fig. 3.4. Piattaforma di ancoraggio della cellula funzionalizzata con oro

Per quanto riguarda lo stress a trazione, è stata progettata dall'Ing. Nicola Scuor e dal Prof. Paolo Gallina una terza tipologia di testa per l'applicazione di una sollecitazione piana multidirezionale alla singola cellula, schematizzata nella figura seguente.

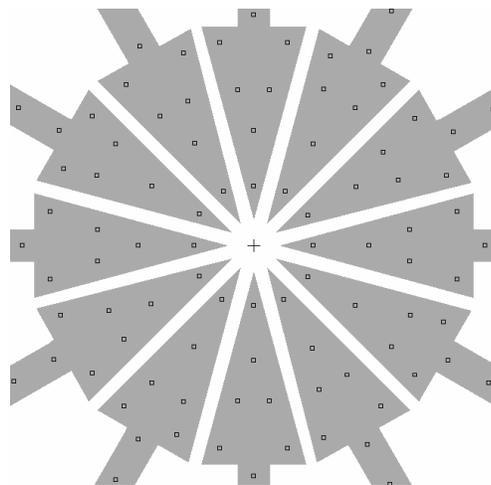


Fig. 3.5. Piattaforma di ancoraggio della cellula per l'applicazione di una sollecitazione piana multidirezionale

Tale piattaforma è movimentata da quattro motori, collegati ai due assi orizzontali e verticali di maggiore lunghezza in figura 3.6, i quali a loro volta movimentano altre due porzioni della piattaforma circolare mediante un sistema di molle flessibili. Le 12 porzioni della piattaforma sono ancorate al substrato mediante molle (in figura, ancoraggi di forma circolare e colore arancione).

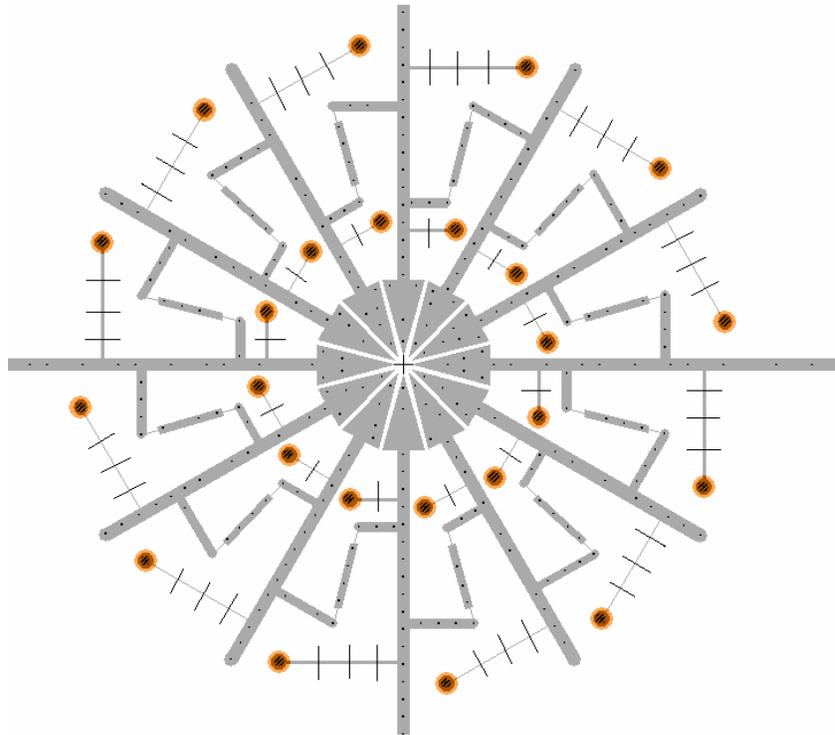


Fig. 3.6. Sistema di assi e molle per la movimentazione della piattaforma per la sollecitazione piana multidirezionale

La piattaforma illustrata in figura 3.5, pur garantendo una tipologia di sollecitazione sempre più vicina agli stimoli biologici, presenta tuttavia una rilevante limitazione dovuta al vuoto centrale di diametro 24 micron. La dimensione media di una cellula appiattita è infatti pari a qualche decina di micron (20-50 micron); solamente alcune particolari tipologie di cellule possono arrivare a dimensioni di qualche centinaio di micron. Uno spazio vuoto di simili dimensioni non avrebbe garantito una zona sufficientemente ampia per l'ancoraggio cellulare, o avrebbe limitato l'utilizzo del dispositivo MEMS alle sole cellule di grosse dimensioni. Per questo motivo, è stata successivamente sviluppata una piattaforma analoga, tale però da diminuire la spaziatura centrale, rispettando comunque le prescrizioni e limitazioni del processo PolyMUMPs, che definiscono la minima *feature*

realizzabile a 2 micron. Il risultato della rielaborazione è la piattaforma in figura 3.7, che presenta un foro centrale pari a 10 micron.

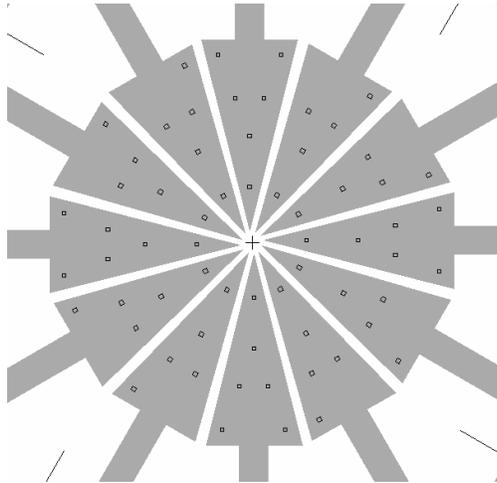


Fig. 3.7. Rielaborazione della piattaforma per la sollecitazione multidirezionale

E' stata infine progettata e realizzata una piattaforma per l'applicazione di una sollecitazione di taglio alla cellula in indagine, illustrata nella figura 3.8.

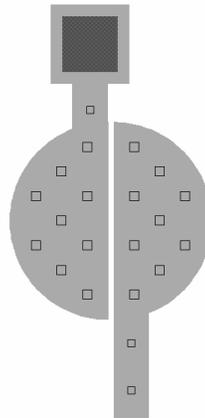


Fig. 3.8 Piattaforma per l'applicazione di una sollecitazione di taglio alla singola cellula

3.2.1.2 Motori per l'attuazione del dispositivo

I motori generalmente impiegati per la movimentazione ed attuazione di dispositivi MEMS sono di due tipi: motori ad attuazione elettrostatica e motori ad attuazione termica.

Motori ad attuazione elettrostatica

L'anniversario del bicentenario della legge di Coulomb è passato da ormai più di dieci anni. Tuttavia, la maggior parte dei sistemi micro- e nano-elettromeccanici sfruttano la forza di Coulomb per afferrare, pompare, flettere, far girare e scorrere le loro strutture mobili:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (3.3)$$

I primi lavori sperimentali in quest'area risalgono al 1967 (Nathanson *et al.*). Nel loro lavoro, infatti, Nathanson e i suoi collaboratori descrivono la realizzazione e la sperimentazione con un transistor a gate risuonante di dimensioni millimetriche. Da allora, la miniaturizzazione dei dispositivi e dei circuiti integrati secondo la legge di Moore ha consentito la realizzazione di strutture sempre più piccole operanti secondo gli stessi principi. Svariate sono le strutture ad attuazione elettrostatica realizzate: per citare qualche esempio, si ricordano i *micromirror* (che trovano applicazione nell'industria per la realizzazione di proiettori a basso consumo), micropompe, *microswitch*, sensori di pressione, cantilever ... Tra queste, la tecnica di attuazione più adatta alle nostre esigenze è risultata essere l'attuazione elettrostatica mediante *comb drive*.

La struttura base di un motore *comb drive* è illustrata in figura 3.9. Il nome di motore a pettine deriva, intuitivamente, dalla somiglianza della struttura ad una coppia di pettini disposti con i denti incrociati. Una delle due strutture di supporto dei pettini è ancorata al substrato, non ha possibilità di muoversi ed è definita statore. La seconda è invece collegata ad una molla o ad una trave flessibile ed è libera di muoversi. Applicando una differenza di potenziale fra i due *comb*, ne risulta una forza elettrostatica diretta nel verso di avvicinamento dei denti dei pettini. Lo spostamento non è limitato dal fenomeno del *pull-in*, o instabilità strutturale, che tuttavia può creare un'instabilità laterale nel *comb drive*: se la struttura subisce un qualche disturbo laterale che porta all'avvicinamento di

una coppia di denti, il fenomeno del *pull-in* completerà il disturbo provocando la collisione fra due denti. Per questo motivo, la rigidità laterale deve essere progettata in maniera tale da prevenire questa possibilità.

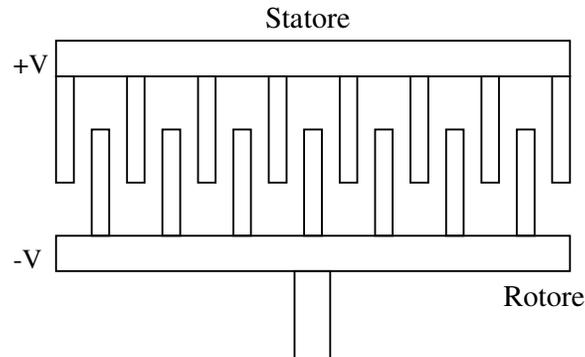


Fig. 3.9. Schema di un attuttore *comb drive*

Il campo elettrico che si sviluppa tra i denti delle due strutture ha due componenti, una lungo l'asse x, l'altra lungo l'asse y. Tuttavia, la sommatoria delle componenti laterali lungo x è nulla. Ne segue che l'unica forza attiva si sviluppa lungo l'asse y, portando rotore e statore ad avvicinarsi. La forza d'attuazione di un *comb drive actuator* può essere valutata come segue (Jaecklin *et al.*, 1992):

$$F = \frac{N\epsilon t V^2}{g} \quad (3.4)$$

dove N rappresenta il numero di elettrodi del comb, ϵ è la costante di permittività, t è lo spessore dei denti del comb, V è il potenziale applicato e g è il gap tra gli elettrodi del comb.

E' stato così progettato il comb drive di figura 3.10, costituito da denti di dimensioni 5 x 35 micron e spessore 3.5 micron. La distanza laterale fra i denti dello statore e del rotore è pari a 3 micron, la distanza longitudinale è pari invece a 23 micron. La parte superiore rappresenta il rotore, quella inferiore, ancorata mediante maschera Anchor1, lo statore.

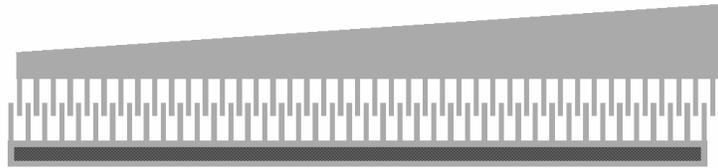


Fig. 3.10. *Comb drive* progettato in L-EDIT

Il *comb drive* appena descritto è stato assemblato insieme ad altre 11 strutture analoghe in una bancata di motori al fine di aumentare la forza esercitata dal dispositivo. Il risultato è il progetto illustrato in figura 3.11.

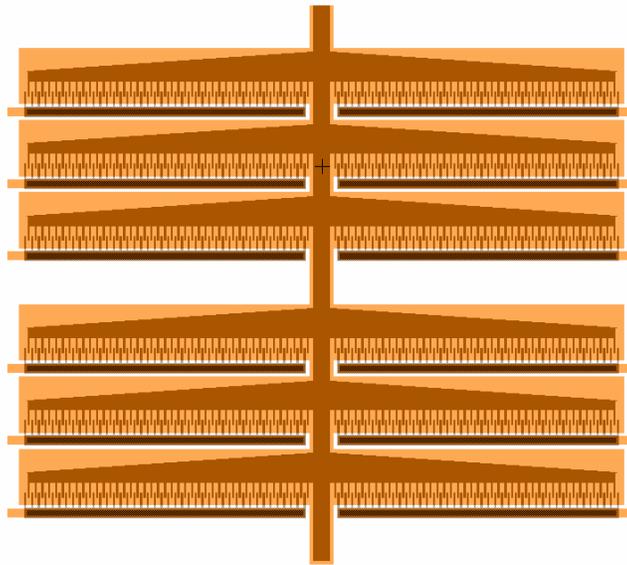


Fig. 3.11. Bancata di 12 *comb drive*

La forza esercitata dal dispositivo, quando il potenziale applicato è pari a 100 V, può essere valutata nel modo seguente, in accordo con l'equazione 3.4:

$$F = \frac{42 \cdot 12 \cdot 8,85 \cdot 10^{-12} \cdot 3,5 \cdot 10^{-6} \cdot 100^2}{3 \cdot 10^{-6}} \approx 52 \mu N \quad (3.5)$$

Motori ad attuazione termica

Per quanto riguarda i motori ad attuazione termica, esistono diverse possibilità realizzative. Il più semplice utilizzo dell'effetto termico nei dispositivi MEMS è l'attuazione basata direttamente sull'espansione termica. Un tipico sistema è schematizzato nella figura seguente.

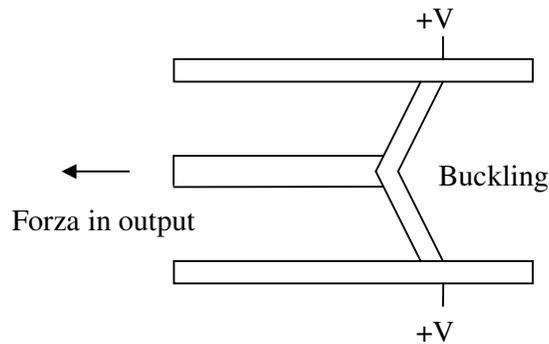


Fig. 3.12. Schema di un attuatore V-beam

Nel presente caso, una trave elastica è fissata fra due supporti rigidi. Il passaggio di una corrente provoca il riscaldamento per effetto Joule della trave micrometrica e ne causa l'espansione. Dal momento che la trave non può espandersi nella direzione lungo il suo asse, ne risulta un cedimento o *buckling* della trave. Se la trave è intagliata da un lato oppure fabbricata secondo una forma a "V", questa avrà un cedimento preferenziale secondo la direzione ed il verso desiderati. Di conseguenza, la barra -o qualsiasi altra struttura meccanica attaccata alla trave- consente di reindirizzare la forza di buckling ed utilizzarla per compiere lavoro. Analizzando analiticamente il sistema, è possibile derivare il valore di pressione critica, o Carico di Eulero, alla quale si verifica il buckling della trave:

$$P_c = \frac{\pi^2 EI}{L} \quad (3.6)$$

dove E è il modulo di Young del materiale costituente la trave, I è il momento d'inerzia ed L è la lunghezza della trave. Lo stress causato da una differenza di temperatura può essere valutato come

$$P = \alpha AE(T - T_0) \quad (3.7)$$

dove α è il coefficiente di dilatazione termica del materiale ed A è l'area della sezione della trave.

Da ciò si deriva che la temperatura critica alla quale si verifica il cedimento è pari a

$$T_c = T_0 + \frac{\pi^2 I}{\alpha AL^2} \quad (3.8)$$

Inserendo l'equazione che determina l'allungamento di una trave ad una certa temperatura, di cui si omettono i passaggi in dettaglio ma si rimanda a [3], si giunge alla definizione del massimo spostamento che si verifica ad $L/2$ per un attuatore termico V-shaped:

$$v(L/2) = \frac{2L}{\pi} \sqrt{\alpha(T - T_c)} \quad (3.9)$$

La tipologia di attuazione appena descritta è tuttavia poco impiegata nella pratica, dal momento che il rapporto fra la forza in uscita e le dimensioni del sistema è poco favorevole per questa geometria. Al fine di superari i limiti di quello che viene definito *thermoelastic V-beam actuator*, è stata introdotta una seconda tipologia di attuazione che impiega un attuatore termico bimorfo (Comtois and Bright, 1997), di seguito descritto in dettaglio.

Tale sistema sfrutta un braccio freddo ed uno caldo ancorati da un lato e liberi di muoversi dall'altro (Fig. 3.13). Una corrente viene fatta passare attraverso l'intero sistema da un ancoraggio all'altro. Dal momento che il braccio caldo è molto più sottile rispetto al braccio freddo, la sua resistenza al passaggio della corrente è molto più alta. Questo significa che il riscaldamento per effetto Joule provocherà un notevole aumento della temperatura nel braccio caldo, mentre la temperatura del braccio freddo rimarrà relativamente inalterata. In questo modo, nel momento in cui il braccio caldo si espande a causa dell'aumento di temperatura, in esso si svilupperanno elevati stress termici tali da flettere l'intero sistema secondo la direzione indicata in figura 3.13.

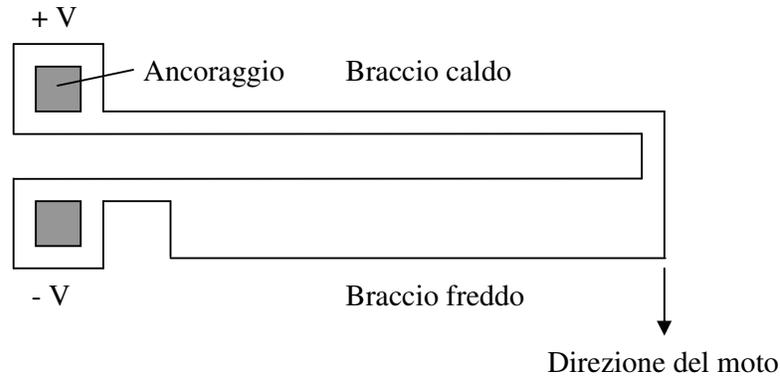


Fig. 3.13. Schema di un semplice attuatore termico

Dall'analisi analitica del sistema, di cui si omette la trattazione rimandando a [3], si giunge alla definizione della massima deflessione di un attuatore bimorfo di lunghezza L :

$$v(L) = -\frac{\alpha(T_h - T_c) L^2}{2 h} \quad (3.10)$$

dove T_h e T_c rappresentano rispettivamente la temperatura del braccio caldo e freddo ed h identifica la differenza fra le larghezze dei due bracci.

Comparando le equazioni 3.9 e 3.10 è possibile notare come il massimo spostamento di una struttura V-beam aumenti con la radice quadrata del gradiente di temperatura nel sistema, $T - T_c$, mentre il massimo spostamento di un bimorfo aumenti linearmente con il gradiente di temperatura imposto, $T_h - T_c$. Il bimorfo mostra inoltre una dipendenza dalla lunghezza della trave L e dalla differenza fra le larghezze dei bracci caldo e freddo h .

Com'è facilmente intuibile, l'attuatore scelto per la movimentazione del dispositivo MEMS è un attuatore bimorfo. Il disegno delle maschere in L-EDIT è il seguente:

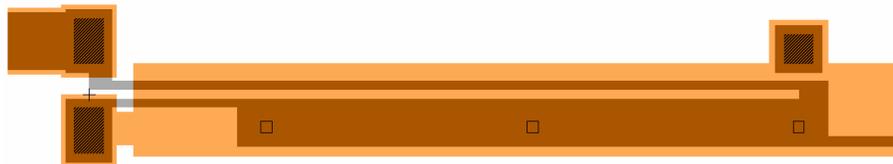


Fig. 3.14. Signolo attuatore termico

La zona arancione rappresenta il POLY0 di base impiegato come pista per portare corrente al sistema. La parte marrone rappresenta invece il POLY2 strutturale. Anche nel

presente caso non si evidenzia per semplicità il POLY1, comunque presente. La lunghezza dell'attuatore, esclusi gli ancoraggi, è pari a 485 micron, la larghezza dei bracci caldo e freddo è pari rispettivamente a 6 e 32 micron. Per aumentare la forza d'attuazione del sistema, è stata realizzata una bancata di attuatori suddivisi su due serie simmetriche, come illustrato nella figura seguente.

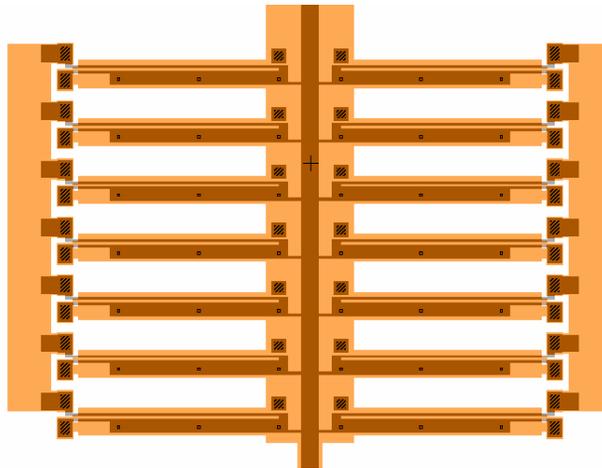


Fig. 3.15. Bancata di attuatori termici

3.2.1.3 Molle di ancoraggio

Per ancorare i rotori al substrato ed impedirne gli spostamenti laterali, come accennato al paragrafo precedente, è necessario utilizzare delle molle che siano sufficientemente resistenti e rigide da vincolare la struttura al MEMS, ma molto cedevoli in modo da non gravare eccessivamente sulla rigidità del sistema. In figura 3.16 è illustrato il disegno in L-EDIT delle molle impiegate.

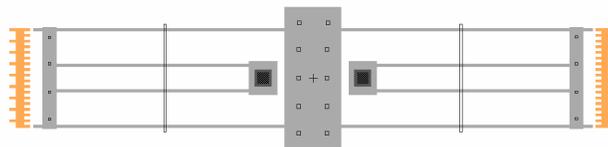


Fig. 3.16. Progetto della molla in L-EDIT

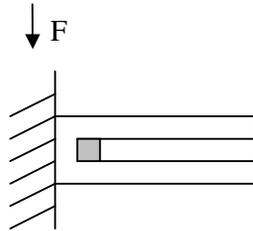


Fig. 3.17. Schema della molla

In figura 3.17 è illustrato uno schema della molla progettata, che può essere ricondotto per l'analisi allo schema di figura 3.18.

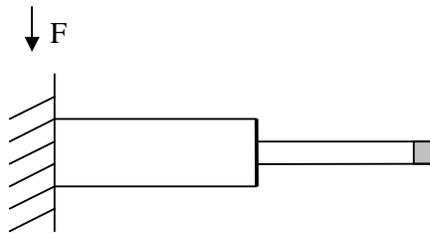


Fig. 3.18. Modello avanzato della molla

Esplicitando la teoria delle travi lineare di Saint-Venant (Gere, 1991), lo spostamento complessivo delle quattro travi è dato da:

$$s = s_1 + s_2 = \frac{l_1^3}{12EJ_1} \left(\frac{F}{2} \right) + \frac{l_2^3}{12EJ_2} \left(\frac{F}{2} \right) \quad (3.11)$$

dove l_1 ed l_2 rappresentano rispettivamente la lunghezza delle travi interne ed esterne, E il modulo di Young e J il momento d'inerzia.

La rigidezza complessiva di una molla può essere calcolata secondo la seguente equazione:

$$k = \frac{F}{s} = \frac{24EJ_1J_2}{J_1l_2^3 + J_2l_1^3} = 1,452N/m \quad (3.12)$$

3.2.1.4 Outline complete dei MEMS di prima generazione

Assemblando una piattaforma per la deposizione della cellula, la bancata di motori elettrostatici e le molle; inserendo i *tool* per l'attuazione del sistema, ovvero le piste per la conduzione elettrica in POLY0 (evidenziate in arancione) e i pad per la connessione elettrica al chip carrier macroscopico, è stata realizzata l'*outline* 2x2 mm del *cell-stretcher* ad attuazione elettrostatica per l'applicazione di una sollecitazione di tipo biassiale sulla singola cellula (Scuor *et al.*, 2006), illustrata in figura 3.19.

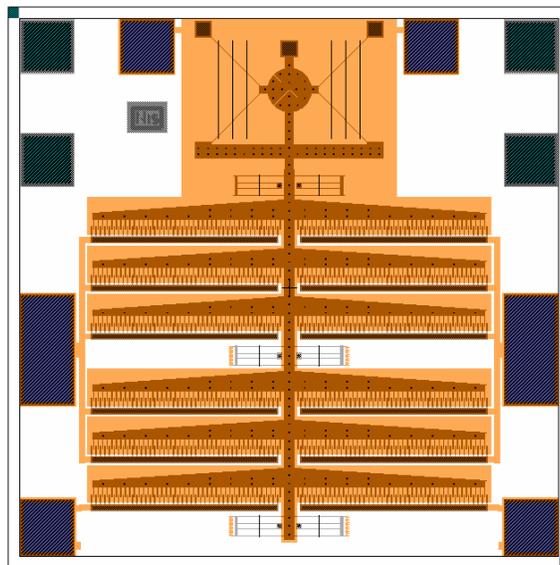


Fig. 3.19. *Cell-stretcher* con motori elettrostatici

I pad di colore blu sono elettricamente connessi al POLY0; i pad di colore verde scuro, invece, hanno una maschera centrale Anchor2 che garantisce l'asportazione del nitruro di silicio e quindi la connessione elettrica con il wafer di silicio sottostante.

Analogamente, assemblando un piattaforma per la singola cellula, la bancata di motori termici, le molle e i *tool* per la conduzione elettrica, si è ottenuta l'*outline* 2x2 mm del *cell-stretcher* con motori termici bimorfi per l'applicazione di uno stress biassiale sulla singola cellula (figura 3.20).

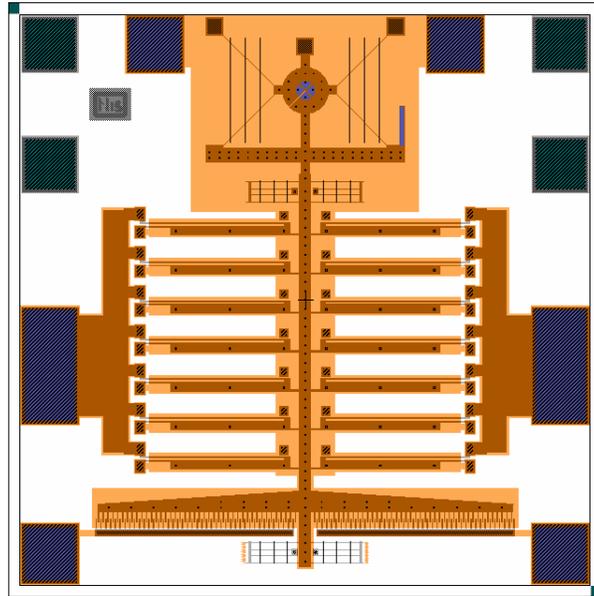


Fig. 3.20. Cell-stretcher con attuatori termici

Infine, assemblando una piattaforma per la sollecitazione piana multidirezionale, bancate di 8 motori termici ed i *tool* per la conduzione elettrica, si è ottenuta l'outline 2x2 mm del *cell-stretcher* con motori termici bimorfi per l'applicazione di uno stress pluriassiale sulla singola cellula (figura 3.22).

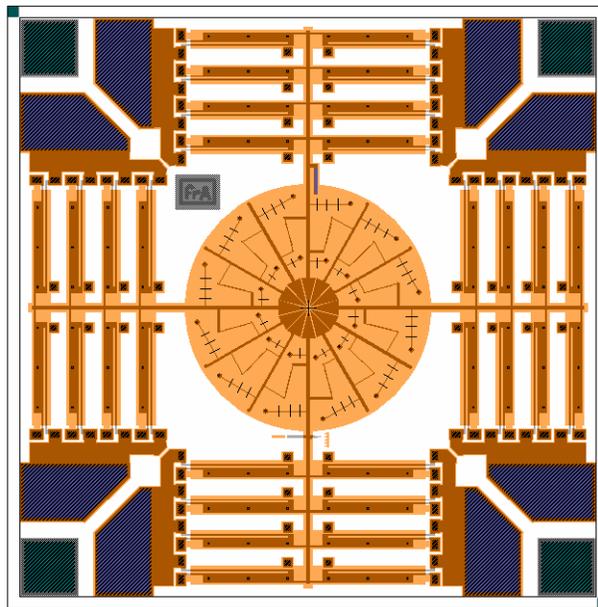


Fig. 3.22. Cell stretcher pluriassiale con attuatori termici

La figura 3.23 riporta lo stesso dispositivo MEMS, in cui però la piattaforma centrale è stata sostituita dalla piattaforma rielaborata secondo le modalità definite al paragrafo precedente al fine di diminuire il vuoto centrale, in cui la cellula non avrebbe trovato materiale per l'ancoraggio.

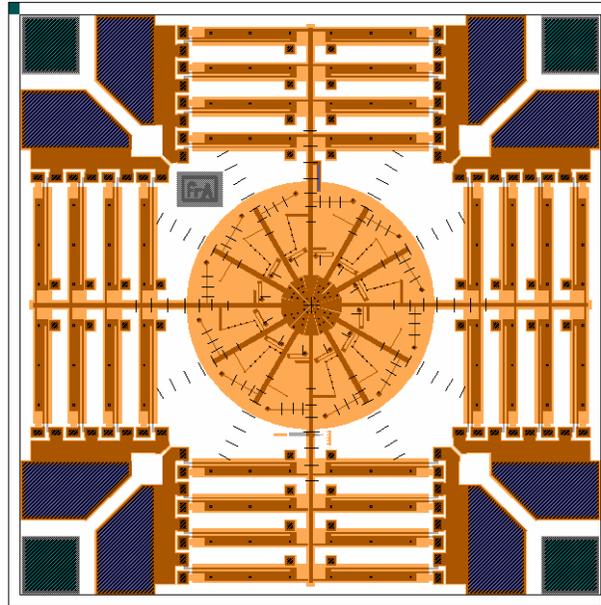


Fig. 3.23 Cell stretcher pluriassiale ottimizzato con attuatori termici

3.2.2 MEMS di seconda generazione

I MEMS definiti di prima generazione sono stati testati e caratterizzati sperimentalmente (si rimanda tuttavia la discussione dettagliata al capitolo seguente). Tuttavia, con questi non si sono potuti effettuare test su cellule viventi dal momento che entrambe le tipologie di motori presentavano una serie di problematiche quando attuati in ambiente liquido conduttivo, descritte in dettaglio al paragrafo seguente. Per questo motivo sono stati progettati dei nuovi dispositivi costituiti da due MEMS di 2x2 mm: il primo, operante in soluzione salina, deputato al posizionamento della cellula; il secondo, operante in aria, costituito da attuatori per la movimentazione dell'intero sistema. Tali MEMS saranno descritti al paragrafo 3.2.2.2.

3.2.2.1 Problematiche relative all'attuazione in ambiente liquido

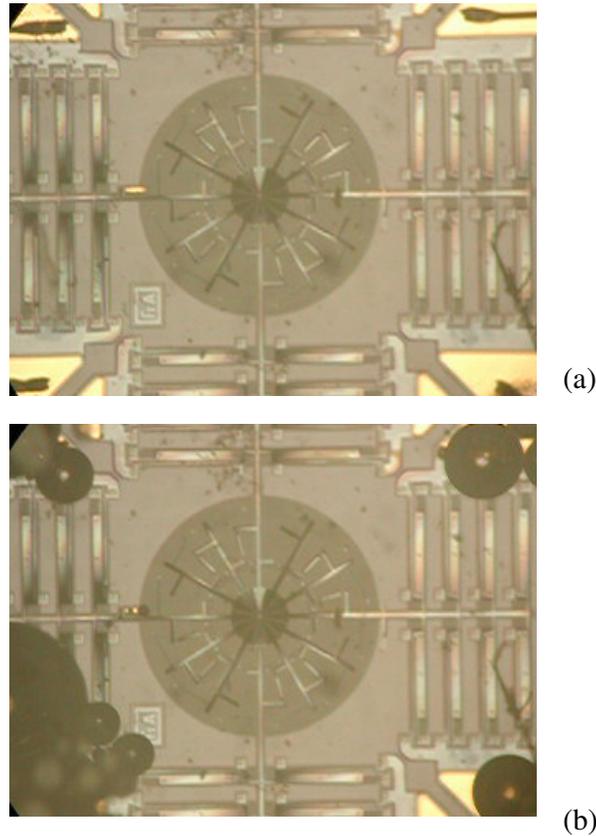
Le quattro principali problematiche relative all'attuazione di microattuatori MUMPs in ambiente liquido sono, in ordine di importanza, la tensione superficiale, l'elettrolisi, la conduttività termica e la conduttività elettrica (Sameoto *et al.*, 2004). In dettaglio:

- Tensione superficiale: attuare un motore MUMPs all'interfaccia aria/acqua non è semplice, dal momento che l'acqua fluisce sotto l'attuatore. Le risultanti forze di stiction potrebbero essere così elevate da impedire la movimentazione della struttura. Inoltre, alcune particolari geometrie possono trattenere bolle d'aria intrappolate sotto le strutture quando l'acqua è disposta sopra l'intero chip. I motori elettrostatici sono più vulnerabili a tale fenomeno rispetto agli attuatori termici.
- Elettrolisi: l'elettrolisi può verificarsi in acqua deionizzata se un potenziale DC superiore a 1.23 V viene applicato fra gli elettrodi sommersi (Zumdahl, 1995). Tale processo, secondo il quale l'acqua viene scissa in idrogeno ed ossigeno rispettivamente all'anodo e al catodo, può produrre quantità notevoli di bolle di gas sottacqua (Fig. 3.24).
- Conduttività termica: un lavoro di Hickey *et al.* fornisce una temperatura massima di lavoro approssimativa pari a

$$T_{\max} = \frac{V^2}{R} \frac{\Delta z}{k_{\text{med}} P / 2L} \quad (3.13)$$

dove Δz rappresenta la distanza fra l'attuatore ed il substrato, L è la lunghezza, P è il perimetro, R è la resistenza e V è il potenziale attraverso l'attuatore. Questa equazione indica che la temperatura (e l'espansione) dovrebbe essere proporzionale alla conduttività termica del mezzo in cui si opera. Nel caso dell'acqua, ad esempio, la conduttività termica è approssimativamente 20 volte maggiore di quella dell'aria ($k_{\text{acqua}}=0.613 \text{ W (mK)}^{-1}$, $k_{\text{aria}}=0.0263 \text{ W(mK)}^{-1}$ a 300 K).

- Conduttività elettrica: se il medium è elettricamente conduttivo, la corrente può bypassare gli attuatori, riducendo la potenza disponibile ed intaccandone negativamente l'efficienza degli attuatori.



**Fig. 3.24. Attuazione di motori termici in acqua demonizzata:
(a) potenziale applicato pari a 1 V; (b) potenziale applicato pari a 2 V**

A queste problematiche, sono state proposte alcune soluzioni:

- Tensione superficiale: se la tensione superficiale dell'acqua viene eliminata operando con il MEMS completamente immerso, non si incontrano problemi di stiction maggiori di quanto non si abbia già in aria. Asciugando l'attuatore, questo sarà completamente adeso al substrato; immergendolo nuovamente in acqua, sarà tuttavia pronto per ulteriori esperimenti.
- Elettrolisi: il problema dell'elettrolisi può essere risolto impiegando segnali di corrente in onde quadre ad alta frequenza, con un valore medio pari a zero. Il segnale alternato in onda quadra ha lo scopo di alternare anodo e catodo. Dal momento che le reazioni chimiche che si verificano durante l'elettrolisi vengono invertite molto rapidamente, non si verifica nessuna generazione di gas a nessuno dei due elettrodi (Selvaganapathy *et al.*, 2002).

- Conduttività termica: gli attuatori che richiedono una differenza di temperatura interna come gli attuatori bimorfi non sono una scelta ottimale per le operazioni in ambiente liquido dal momento che l'alta conduttività termica del liquido impedisce il verificarsi di qualsiasi differenza di temperatura significativa tra due travi spaziate di pochi micron. Inoltre, sono richiesti incrementi di potenza per raggiungere la stessa temperatura e quindi deflessione che possono essere ottenute in aria.
- Conduttività elettrica: la conduttività elettrica può essere ridotta impiegando acqua deionizzata. Tuttavia, una cellula vivente ha bisogno di soluzioni saline contenenti ioni Ca^{++} , Na^+ , Cl^- , K^+ , ... per poter sopravvivere. Per questo motivo, è risultato sostanzialmente impossibile operare sia con comb drive, i cui condensatori si cortocircuitano limitando notevolmente o addirittura annullando la forza di attuazione elettrostatica, sia con attuatori elettrici a causa del passaggio di correnti che oltre a diminuire l'efficienza dell'intero sistema, andrebbero a compromettere la stabilità della cellula.

3.2.2.2. Progettazione dei MEMS di seconda generazione

Analogamente a quanto descritto all'inizio di questo capitolo, le componenti essenziali di dispositivi MEMS per lo studio delle proprietà meccaniche della singola cellula sono la piattaforma per la collocazione della cellula sotto studio e il motore d'attuazione. Gli ambienti operativi dei due sistemi sono risultati incompatibili: la cellula, per vivere in condizioni biologiche senza alterazioni dall'esterno, ha bisogno di essere immersa in medium salini contenenti ioni calcio, sodio, potassio, ... Inoltre deve essere mantenuta a 37°C , con concentrazione di CO_2 costante pari al 5%, e non deve essere possibilmente soggetta a campi elettrici o passaggio di corrente, che possono andare ad alterare in maniera non ponderabile il suo comportamento. I motori, invece, per garantire il massimo della potenza, è bene che operino in aria (gli attuatori termici aumentano addirittura lo spostamento quando operano in condizioni di alto vuoto). Per questo motivo, per proseguire la sperimentazione, è stata concepita una nuova tipologia di dispositivi per lo studio della biomeccanica cellulare. Il dispositivo definito di seconda generazione è costituito da due outline di 2×2 mm: la prima, costituita di piattaforme per il posizionamento della singola cellula, operante in medium cellulare; la seconda,

costituita di bancate di motori termici oppure elettrostatici, operante in aria. Il collegamento meccanico fra le due si effettua in una fase successiva mediante wire bonding oppure mediante fibra di carbonio.

Piattaforme per la deposizione della cellula

Si riportano di seguito le outline dei MEMS in cui sono state collocate diverse piattaforme per il posizionamento della cellula. In figura 3.25 si riporta un MEMS con piattaforme con possibilità di attuazione uniassiale e biassiale. In figura 3.26 sono mostrate invece delle teste per l'applicazione di sollecitazioni di taglio. In entrambe le figure è possibile osservare dei quadrati blu di grandi dimensioni: essi rappresentano le piazzole, di 200 x 200 micron circa, ricoperte con film d'oro, realizzate per poter creare, in fase successiva, il collegamento meccanico fra teste e motori.

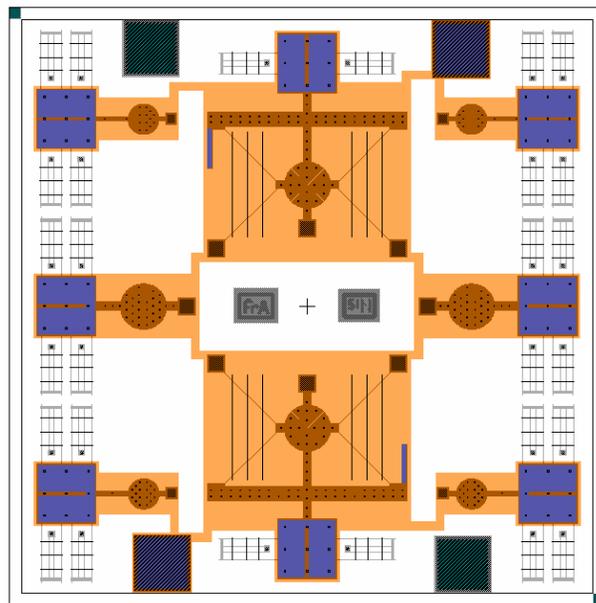


Fig. 3.25. MEMS con piattaforme per l'applicazione di stress uniassiale e biassiali

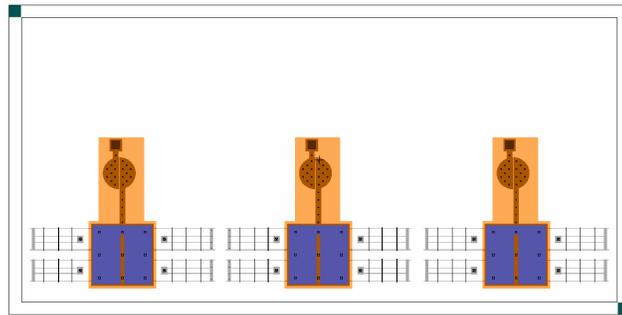


Fig. 3.26. MEMS con piattaforme per l'applicazione di sollecitazioni di taglio

Motori elettrostatici e termici

Analogamente a quanto discusso precedentemente per i MEMS di prima generazione, anche nel presente caso sono state realizzate due tipologie di motori, rispettivamente ad attuazione elettrostatica e termica. La figura 3.27 riporta l'outline di un MEMS del primo tipo.

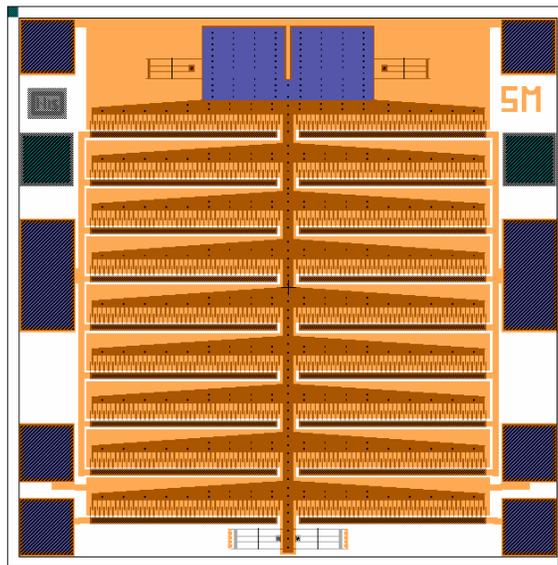


Fig. 3.27. MEMS con motore elettrostatico

La figura 3.28 mostra invece un MEMS con motore termico.

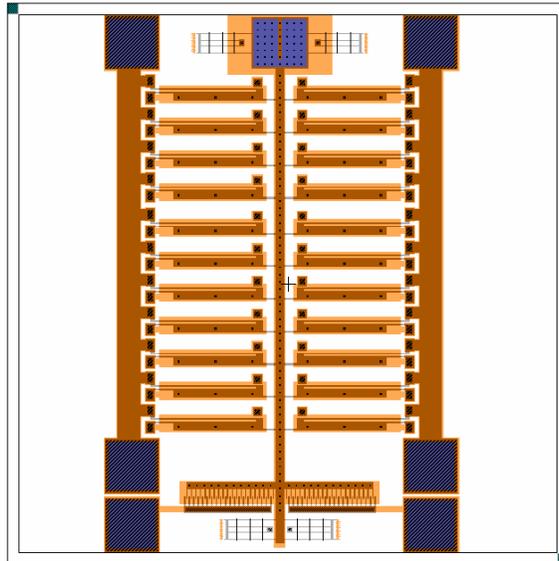


Fig. 3.28. MEMS con motore termico semplice

Al fine di aumentare gli spostamenti, è stato progettato e realizzato un secondo motore termico. Esso è costituito da quattro serie di motori termici, a differenza delle due del precedente, collegate mediante tre assi. Il risultato è illustrato in dettaglio in figura 3.29, in figura 3.30 nel motore complessivo.

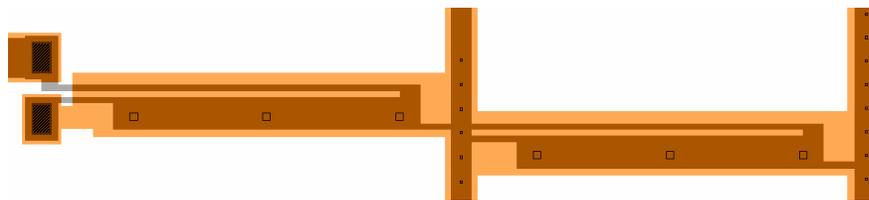


Fig. 3.29. Dettaglio del collegamento fra gli attuatori termici del MEMS con amplificazione dello spostamento

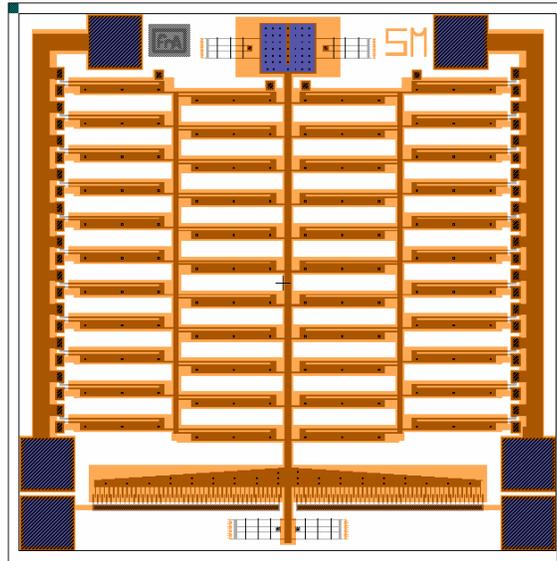


Fig. 3.30. MEMS con motore termico a due bancate per incrementare lo spostamento

Collegamento meccanico fra i due MEMS

Il collegamento meccanico fra i due MEMS deve essere sufficientemente piccolo da adattarsi ed integrarsi con le strutture microscopiche dei dispositivi, sufficientemente rigido da non deformarsi durante la prova ed infine deve creare una buona adesione con le piazzole di entrambi i MEMS. Si sono scelte due strade per la creazione del collegamento meccanico fra i MEMS:

- 1) Collegamento mediante filo d'oro di 25 micron di diametro saldato su entrambe le piazzole mediante wire bonding
- 2) Collegamento mediante fibra di carbonio ancorata alle due piazzole mediante wire bonding oppure mediante un sistema adesivo.

Per la descrizione dettagliata delle due tecniche, si rimanda al capitolo seguente.

Firma

Si riporta per completezza e per curiosità un ultimo dettaglio che solitamente si inserisce nell'outline del MEMS, ovvero la firma.

In figura 3.31 se ne riportano il disegno in L-EDIT ed un'immagine al Microscopio Elettronico a Scansione.

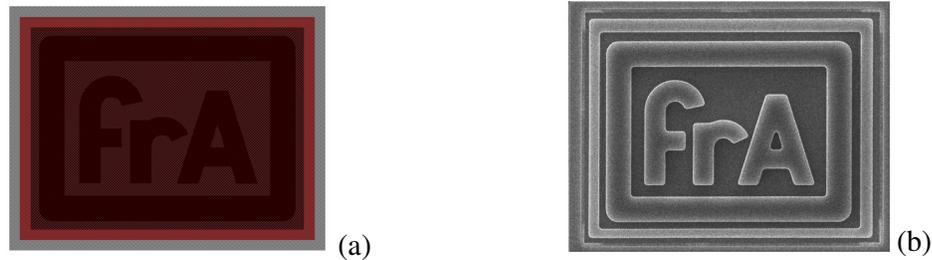


Fig. 3.31. Firma (a) progetto in L-EDIT; (b) immagine al SEM

Bibliografia

- [1] <http://www.tasc.infm.it/index.htm>
- [2] <http://www.itc.it/irst/Renderer.aspx?targetID=111>
- [3] JA Pelesko and DH Bernstein, Modeling MEMS and NEMS, Chapman & Hall/CRC, 2003.
- [4] SE Lyshevski, Nano- and Microelectromechanical Systems – Fundamentals of Nano- and Microengineering, CRC Press LCC, 2001.
- [5] PoluMUMPS FAQ, Revision 2.0, MEMSCAP (2004)
- [6] Ballestrem, C, B Wehrle-Haller and BA Imhof (1998) Actin dynamics in living mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 111: 12 1649-1658.
- [7] Comtois, JH and VM Bright (1997). Application for Surface–Micromachined Polysilicon Thermal Actuators and Arrays. *Sensors and Actuators A*, 19-25.
- [8] Gere, JM and SP Timoshenko, Mechanics of Materials (2nd ed. Springer NY, 1997).
- [9] Hickey R *et al.* (2002). Analysis and designs of polysilicon thermal plexure actuators. *J. Micromech. Microeng.*, 9 64-70.
- [10] Jaecklin, VP, NF de Rooij and JM Moret (1992). *Journal of Micromechanics and micrengineering*, 2 250-255.
- [11] Koester, D, Cowen A, Mahadevan R, Stonefield M, Hardy B (2003). PolyMUMPs Design Handbook, Revision 10.0. Memscap Inc.

- [12] Liu C, Tsao T, Tai Y. A high-Yield Drying Process for Surface Microstructures using Active Levitation. California Institute of Technology, Pasadena
- [13] Nathanson, HC, Newell WE, RA Wickstrom and JR Davis (1967). The resonant Gate Transistor. *IEEE Trans. On Electron Devices*, 14 117-133.
- [14] PolyMUMPs FAQ, Revision 1.0, Memscap Inc. (2004)
- [15] Selvaganapathy P *et al.* (2002). Bubble-free electrokinetic pumping. *J. Microelectromech. Syst.* 11 448-53.
- [16] Scuur, N, P. Gallina, H.V. Panchawagh, R.L. Mahajan, O. Sbaizero and V. Sergio (2006). Design of a novel MEMS platform for the biaxial stimulation of living cells. *Biomed Microdevices*, 8:239-246.
- [17] Tarone, G, G Galetto, M Prat and PM Comoglio (1982) Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins. *The Journal of Cell Biology*, 94, 179-186.
- [18] Yam, PT, CA Wilson, L Ji, B Hebert, EL Barnhart, NA Dye, PW Wiseman, G Danuser and JA Theriot (2007) Actin–myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *The Journal of Cell Biology*, 178:7 1207-1221.
- [19] Yan D, (2002). Mechanical Design and Modeling of MEMS Thermal Actuators for RF Applications. Master thesis, University of Waterloo.
- [20] Zumdahl SS, 1995. Chemical Principles 2nd edn (DC: Heath and Company), 477-

Capito 4.

Post-processing dei dispositivi

Einstein, stop telling God what to do!

Niels Bohr

Il presente capitolo descrive la messa a punto di due tecniche di post-lavorazione dei dispositivi MEMS: la prima rivolta alla creazione di un substrato biocompatibile per promuovere l'adesione della cellula alla piattaforma d'analisi; la seconda rivolta alla creazione di un collegamento meccanico fra i due MEMS definiti di seconda generazione, ovvero fra il dispositivo con le piattaforme d'analisi operante in ambiente liquido ed il dispositivo con gli attuatori operante in aria.

4.1 Funzionalizzazione del substrato

4.1.1 Introduzione al problema

Le cellule viventi hanno necessità restrittive per il mantenimento in coltura: esse crescono in media cellulari che contengono soluzioni equilibrate di sali, glucosio, aminoacidi, vitamine e fattori di crescita. Inoltre, oltre a dover essere mantenute alla temperatura di 37°C, umidità del 100% e pH pari a 7.2, la maggior parte delle cellule tissutali cresce come *monolayer* aderente ed ha bisogno di aderire ed appiattirsi sul substrato prima di iniziare a prosperare e proliferare (Freshney, 2000). Normalmente,

infatti, le cellule interpretano la mancanza di adesione come un segnale di autodistruzione. Per le colture nei laboratori di ricerca, le cellule vengono cresciute sulla superficie inferiore di fiasche e dischi di petri di vetro o polistirene opportunamente trattati. Per le applicazioni industriali che richiedono un numero elevato di cellule, queste possono essere coltivate anche su microsferi opportunamente funzionalizzate sospese in taniche rotanti (Nelson and Chen).

Come accennato al capitolo 1, l'adesione cellulare è mediata da recettori specifici della membrana cellulare che interagiscono con le molecole della matrice extracellulare (ECM). *In vivo*, le cellule sono infatti circondate da ECM, che consente l'organizzazione cellulare in tessuti. L'ECM forma gli scaffold polimerizzati -quali fibre collagene, elastine, proteoglicani e glicoproteine come fibronectina e laminina- che tengono assieme i tessuti. Le molecole che costituiscono l'ECM si trovano normalmente in alcuni media cellulari e sono secrete dalle cellule stesse. In coltura, l'adesione e l'appiattimento cellulare sono preceduti dall'assorbimento di ECM sulla superficie del substrato. Le cellule sono quindi incapaci di attaccarsi e diffondere in quei substrati che resistono all'assorbimento dell'ECM. Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'adesione cellula-ECM non è meramente un'immobilizzazione della cellula, ma ha molte conseguenze funzionali che includono cambiamenti nella sopravvivenza, crescita, metabolismo, sintesi delle proteine ed espressione genica (Schwartz *et al.*, 1995). La regolazione delle funzioni cellulari governate dall'adesione cellula-ECM non è tuttavia ancora completamente compresa ed è attualmente un'area attiva di indagine. Nonostante comunque vi siano molti tipi di recettori per l'adesione cellulare, l'adesione cellula-ECM è mediata primariamente da membri della famiglia delle integrine. Le integrine formano un importante legame bidirezionale fra la cellula e l'ambiente esterno. Questo significa che le cellule utilizzano le integrine per rilevare cambiamenti nella composizione dell'ECM e rispondono modificando il loro comportamento. Le cellule possono anche cambiare i livelli di integrine disposti sulla superficie cellulare in modo da alterare l'adesione cellulare. Un esempio è dato dal fatto che le cellule devono regolare in maniera dinamica l'espressione delle integrine qualora vogliano passare da una condizione di mera aderenza al substrato ad una condizione di alta motilità.

In questi ultimi anni sono state sviluppate diverse strategie per controllare l'adesione cellula-ECM; la maggior parte di queste si affida al controllo del posizionamento dell'ECM in superficie.

La tecnica tipicamente impiegata è l'assorbimento aspecifico delle proteine d'interesse dell'ECM da una soluzione prima del posizionamento delle cellule. Il vantaggio dell'assorbimento non-specifico è dato dal fatto che è un approccio semplice e diretto. Uno svantaggio è invece dato dal fatto che il substrato che si viene a formare è intrinsecamente instabile dal momento che il processo si basa su interazioni non-covalenti fra le proteine d'interesse e la superficie.

Un'altra tecnica per il controllo dell'adesione cellulare consiste nell'immobilizzare covalentemente proteine dell'ECM al substrato. Tipicamente, le superfici vetrose o polimeriche sono trattate in modo da presentare un gruppo funzionale attivo, che può reagire con le ammine primarie o altri gruppi presenti nelle proteine. La reazione tra le proteine d'interesse dell'ECM ed il substrato si effettua intuitivamente prima della disposizione delle cellule. Il vantaggio dell'immobilizzazione mediante legami covalenti risiede nella creazione di substrati più stabili rispetto a quelli prodotti dall'assorbimento aspecifico. Tuttavia, la tecnica specifica per l'immobilizzazione covalente non può essere generalizzata: i materiali di superficie sono limitati a quelli che possono essere modificati con funzionalità attive. Un altro svantaggio dell'immobilizzazione covalente è dato dal fatto che la maggior parte delle proteine dell'ECM sono molecole piuttosto grandi e contengono molti gruppi reattivi che possono formare legame con il substrato attivato; in questo modo, analogamente all'assorbimento non-specifico, anche l'immobilizzazione covalente produce superfici eterogenee.

Per superare questi limiti, svariati autori hanno adottato approcci diversi per l'immobilizzazione cellulare, che vanno dall'industria degli enzimi alla modificazione delle estremità proteiche con gruppi funzionali. Questo secondo approccio consente il controllo specifico dell'orientazione delle molecole dell'ECM in superficie, ma è tuttavia un processo oneroso dal punto di vista economico e produce substrati con bassa stabilità (Lee and Mrksich, 2002).

I suddetti approcci sono limitati dal fatto che, controllando le proteine dell'ECM presenti su di un substrato, circoscrivono l'adesione a quelle cellule che esprimono le integrine appropriate. Ad esempio, le superfici funzionalizzate con fibronectina sono in grado di garantire l'adesione alle cellule che esprimono le integrine $\alpha 5\beta 1$ ed altre integrine che si

legano alla fibronectina. Tuttavia la maggior parte delle proteine dell'ECM possono essere legate da diverse integrine, e la maggior parte delle cellule esprime numerose differenti integrine. Quindi, nonostante vi sia una certa specificità nell'adesione all'ECM per le diverse cellule, vi è anche una significativa sovrapposizione.

Nonostante le proteine immobilizzate dell'ECM possano essere impiegate per controllare i processi iniziali di adesione delle cellule al substrato, la maggior parte delle superfici sono instabili in presenza di cellule. Le cellule infatti possono rimodellare le superfici sulle quali sono attaccate anche in tempi piuttosto brevi, due sole ore, ad esempio, secondo Roberts *et al.*. Innanzitutto, infatti, la maggior parte delle cellule produce e secerne molecole endogene che possono essere assorbite in maniera aspecifica sulla superficie o possono legare con le molecole immobilizzate dell'ECM attraverso interazioni specifiche proteina-proteina. Inoltre, le cellule possono rimodellare attivamente il loro substrato secernendo proteasi che possono degradare le molecole dell'ECM immobilizzate. Quindi, anche le immobilizzazioni più stabili chimicamente sono potenzialmente suscettibili al degrado da parte delle cellule.

Ultima considerazione introduttiva: tipicamente, la maggior parte delle applicazioni commerciali e di laboratorio necessita del controllo di popolazioni di cellule aderenti. Alcune applicazioni, tuttavia, come la presente, richiedono un fine controllo spaziale dell'adesione cellulare. Sono state sviluppate diverse strategie di microfabbricazione per creare dei pattern per l'adesione cellulare su scala micrometrica; la maggior parte di questi risiede nel controllo del posizionamento delle molecole dell'ECM o di altri adesivi molecolari in superficie. I microarray che si vengono a creare sono sostanzialmente delle regioni adesive circondate da regioni non adesive, che tipicamente resistono all'adesione cellulare resistendo all'assorbimento di proteine (Lim *et al.*, 2007; Kuschel *et al.*, 2006).

4.1.2 Soluzioni proposte

Sulla base di quanto enunciato al paragrafo precedente, è possibile desumere quali siano i requisiti cui la piattaforma per la collocazione delle cellule debba rispondere:

- a) il materiale costituente deve essere biocompatibile ed idrofilico
- b) deve promuovere l'adesione e l'appiattimento cellulare
- c) non deve alterare il comportamento cellulare
- d) deve garantire un controllo spaziale

Sono state ideate e sviluppate tre possibili soluzioni al problema, basate sull'utilizzo di tre differenti materiali.

- 1) Il **polisilicio** depositato mediante il processo PolyMUMPs risponde al solo requisito di biocompatibilità, in quanto rimane sostanzialmente inalterato se immerso in soluzione fisiologica o medium cellulare e non rilascia materiale in soluzione; ma è un materiale idrofobo, ed in quanto tale non può promuovere l'adesione e l'appiattimento cellulare. La sola possibilità di utilizzo del silicio è la deposizione su di esso di proteine d'interfaccia, che possono essere disposte in maniera uniforme su tutto il MEMS oppure depositate localmente mediante le normali tecniche di microfabbricazione e fotolitografia.
- 2) Altro materiale offerto dal processo PolyMUMPs ed utilizzabile per la funzionalizzazione locale della piattaforma è l'ultimo strato d'**oro**. Come si è visto, però, ai paragrafi precedenti lo strato d'oro ha spessori tali da creare notevoli stress residui sul polisilicio, portando le estremità libere della piazzola a flettersi verso l'alto. L'oro tuttavia potrebbe essere depositato a sua volta in film di spessore nanometrico in un post-processing che preveda la copertura con maschere di tutto il MEMS e che esponga solamente la zona centrale della piattaforma, dove andrà collocata la cellula.
- 3) La soluzione più innovativa, successivamente verificata sperimentalmente, si basa sull'impiego di un **materiale polimerico fotopolimerizzabile** di uso odontoiatrico. Il materiale proposto è un adesivo, Optibond Solo Plus (Kerr, Bioggio, Svizzera), costituito da tre componenti principali:
 - una matrice monomerica a base di BISGMA (bisphenol A diglycidyl dimethacrylate), TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate) e UDMA (urethane dimethacrylate), monomeri che si differenziano per il loro peso molecolare e differente grado di idrofilicità;
 - una bassa percentuale in volume di riempitivo vetroso a base di nano e microparticelle di silice, borosilicato, quarzo, ...
 - una molecola fotosensibile in grado di attivare la reazione di polimerizzazione, sostenuta da un'ammina terziaria.

In questo modo il materiale risponde sicuramente a due dei quattro requisiti principali esposti all'inizio del paragrafo in quanto:

a) è biocompatibile, dato l'utilizzo da diversi anni nella pratica odontoiatrica, ed è sufficientemente idrofilo da interagire con materiali "bagnati" quali la dentina
d) può garantire un controllo spaziale se polimerizzato localmente mediante un laser
I requisiti b) e c) sono quindi stati verificati sperimentalmente su popolazioni cellulari, secondo quanto descritto al paragrafo seguente.

4.1.3 Verifica sperimentale

Sono state condotte delle prove sperimentali qualitative al fine di investigare l'efficacia dell'adesione cellulare ai differenti substrati proposti al paragrafo precedente. Le prove sono state eseguite utilizzando come substrati:

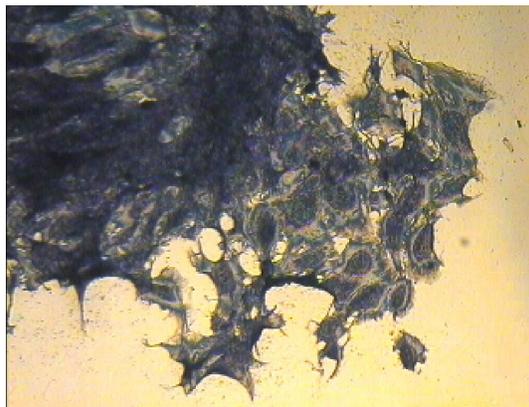
- alcuni frammenti di un wafer di silicio
- pozzetti per colture cellulari funzionalizzati con un sottile film di adesivo Optibond Solo Plus
- pozzetti di polistirene per colture cellulari come controllo.

Tutti i substrati sono stati preventivamente lavati con alcool propilico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sciacquati per tre volte con DPBS (Dulbecco's PhosphateBuffered Saline, Invitrogen S.r.l., S. Giuliano Milanese) e sterilizzati per 4 ore sotto luce UV. Metà dei suddetti campioni sono stati funzionalizzati con fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La fibronectina è stata diluita secondo le prescrizioni del produttore in concentrazione di 1 mg/ml. Successivamente è stata diluita in DPBS fino ad una concentrazione di 40 µg/ml, come da letteratura (Serrel *et al.*, 2007) e depositata sui differenti substrati, successivamente mantenuti per quattro ore alla temperatura di 37°C.

E' stata poi impiegata una fiasca da 25 cm² contenente fibroblasti BHK-21 a confluenza: la fiasca è stata lavata con DPBS e vi è stato inserito 1 ml di tripsina (Invitrogen S.r.l., S. Giuliano Milanese) agente che consente, dopo qualche minuto a 37°C, il distacco delle cellule dal substrato. La soluzione contenente fibroblasti in sospensione è stata diluita in 5 ml di medium; i sei millilitri complessivi sono stati suddivisi in parti uguali in sei pozzetti, contenenti ciascuno i campioni i substrati precedentemente citati. Dopo un giorno di mantenimento alla temperatura di 37°C e CO₂ al 5%, i diversi substrati sono stati lavati con DPBS, fissati con una soluzione di acetone e metanolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in rapporto 3:4 per 10 minuti alla temperatura di 4°C. I campioni sono stati infine colorati con blue di toluidina e tripsina basica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ed osservati al microscopio ottico in riflessione.



(a) Silicio senza fibronectina



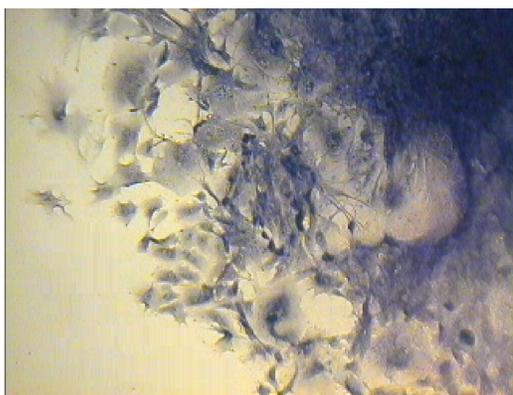
(b) Silicio con fibronectina



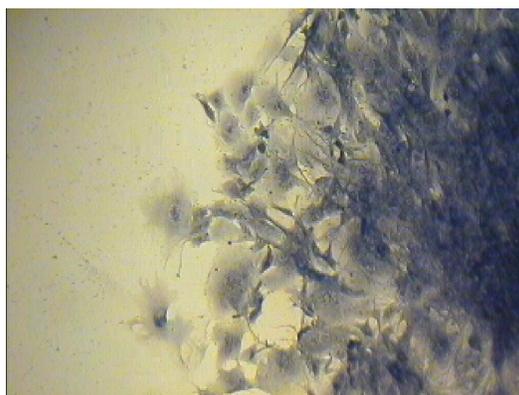
(c) Adesivo senza fibronectina



(d) Adesivo con fibronectina



(e) Pozzetto senza fibronectina



(f) Pozzetto con fibronectina

Fig. 4.1 Prove di adesione cellulare su diversi substrati

In figura 4.1 si riporta un'immagine significativa per ciascun campione. E' possibile osservare come le colture cresciute sul fondo dei pozzetti e sui substrati di adesivo (c ed e) per applicazioni dentarie non presentino sostanzialmente differenze qualora il substrato venga funzionalizzato con fibronectina (d e f). Al contrario, i substrati di silicio consentono l'adesione e lo *spreading* cellulare solo se preventivamente funzionalizzati con fibronectina (a e b).

Prove analoghe sono state condotte con miociti, cellule del muscolo cardiaco, più difficili da gestire rispetto ai fibroblasti in quanto non coltivabili in colture da laboratorio, ma opportunamente preparate da cellule embrionali di topo.

Le prove pertanto sono state eseguite presso l'International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) sito in Area Science Park, Padriciano, Trieste. Sono stati preparati due tipi di substrato:

- substrati di polisilicio, ottenuti utilizzando un MEMS capovolto dopo avervi eseguito lo *stripping* del photoresist
- substrati di adesivo dentario, ottenuti depositando poche gocce di materiale in pozzetti per colture, polimerizzate mediante lampada alogena per 60 secondi.

Nessuno dei due substrati è stato funzionalizzato con fibronectina.

Le prove sperimentali hanno condotto a risultati analoghi a quanto ottenuto con i fibroblasti. In figura 4.2 è possibile osservare come le colture cresciute sui substrati di adesivo (b) siano più densamente popolate rispetto a quelle crescite sui substrati di polisilicio (a) e come le cellule siano più appiattite sul substrato.

L'adesivo per applicazioni dentarie si è quindi rivelato un materiale consono per la crescita cellulare anche in assenza di proteine d'interfaccia.

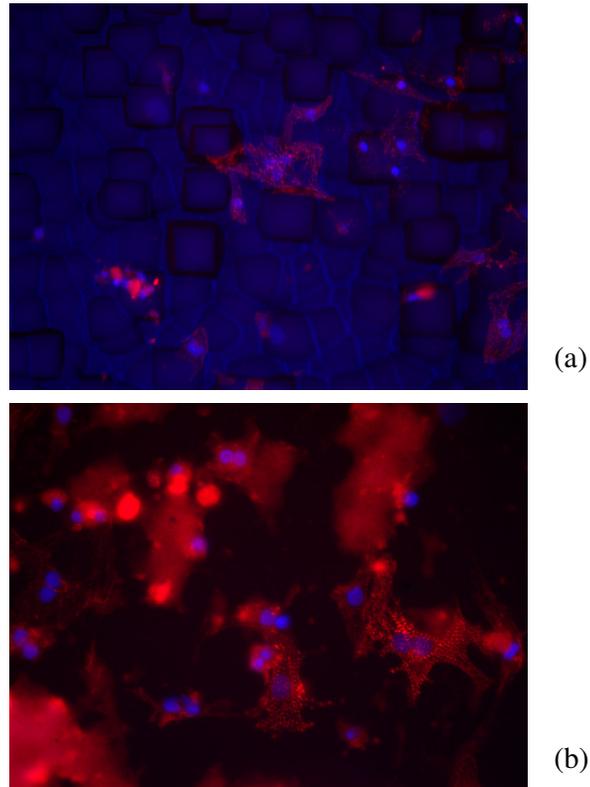


Fig. 4.2 Prove di adesione di miociti su diversi substrati: (a) polisilicio; (b) adesivo dentario

4.1.4 Funzionalizzazione locale

L'adesivo biocompatibile a base di monomeri acrilico-fenolici, oltre a soddisfare i requisiti (b) e (c) citati in precedenza, rispettivamente di promozione dell'adesione e la non alterazione del normale comportamento cellulare, può soddisfare anche il requisito (d) che definisce la possibilità di controllo spaziale, ovvero la possibilità di funzionalizzare localmente determinate zone del substrato.

La tecnica è stata sviluppata *ad hoc*, utilizzando la strumentazione a disposizione presso il Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali. Lampade a luce blu per la polimerizzazione dei materiali dentari erano a disposizione presso il Dipartimento, ma con esse non si sarebbe mai potuto ottenere un controllo micrometrico della fotopolimerizzazione se non utilizzando maschere microfabbricate, di costo elevato e di difficile allineamento, data la mancanza della strumentazione per la microfabbricazione. L'idea è venuta osservando il picco di assorbimento della molecola fotosensibile impiegata in questi materiali, il canforochinone (vedi figura 4.3). Il picco di assorbimento

è centrato sui 468 nm, ma ha la forma di una gaussiana che si allarga fino ai 400 nm alle più basse lunghezze d'onda e fino ai 500 nm verso le più alte lunghezze d'onda. Sono state eseguite, quindi, alcune prove per verificare se il laser verde di lunghezza d'onda pari a 514.5 nm, presente presso lo stesso Dipartimento ed utilizzato per effettuare misure di spettroscopia Raman, potesse polimerizzare l'adesivo dentario. La verifica ha avuto esito positivo ed è stata quindi messa a punto la tecnica di funzionalizzazione della piattaforma del MEMS mediante esposizione dell'adesivo a luce laser convogliata localmente mediante l'obiettivo di un microscopio.

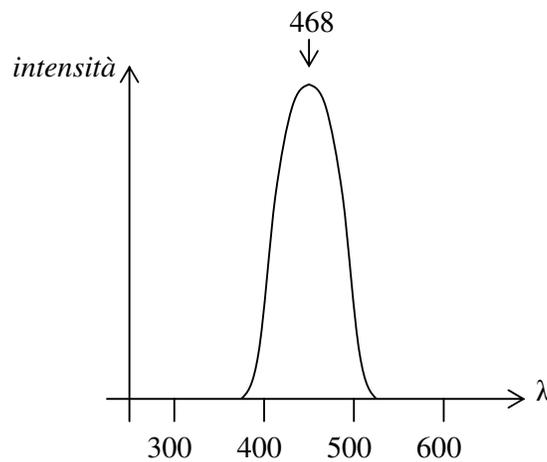
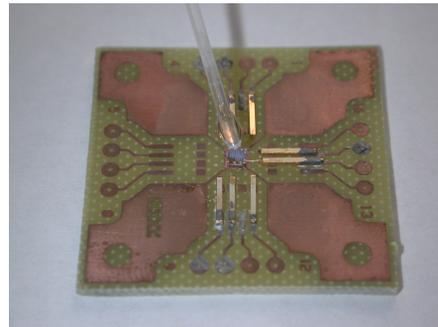
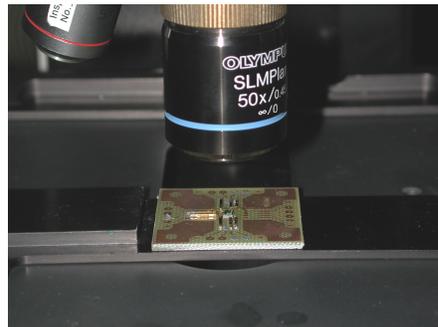


Fig. 4.3 Picco di assorbimento del canforochinone

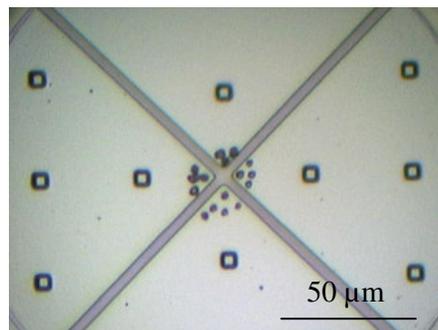
L'adesivo è stato diluito in alcool propilico in percentuali crescenti (1:10, 1:20 e 1:30) allo scopo di ottenere, dopo l'evaporazione del solvente, film molto sottili. Il rapporto ideale è risultato essere 1:20. E' stata depositata una goccia di soluzione sul MEMS (Fig. 4.4 a) -sul quale era stato in precedenza eseguito lo stripping del fotoresist ma non il rilascio delle componenti strutturali- il quale è stato successivamente collocato sullo stage del microscopio del Raman (Renishaw Plc., Gloucestershire, Regno Unito). Il materiale è stato esposto a luce laser, convogliata mediante un obiettivo 50X lungo focale (Fig. 4.4. b) per 30 secondi. Effettuando l'esposizione alla luce laser su diverse zone della piattaforma, si è potuta ottenere la piattaforma funzionalizzata di figura 4.4 c. Successivamente, lo stesso microscopio è stato dotato di uno stage motorizzato per l'effettuazione di mappature (passo laterale pari a 1μm). Grazie a questo *up-grade* dello strumento, effettuando mappature di geometria e dimensioni diverse, si sono potute ottenere le più svariate superfici funzionalizzate per la collocazione della cellula (Fig. d).



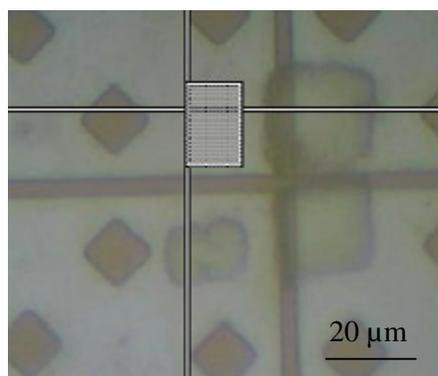
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 4.4 Processo di funzionalizzazione locale mediante adesivo: (a) deposizione dell'adesivo diluito; (b) esposizione alla luce laser; (c) superficie funzionalizzata a spot; (d) superficie funzionalizzata a zone.

4.2 Collegamento meccanico dei MEMS

Altra problematica da affrontare per giungere al corretto e completo funzionamento del dispositivo è stata l'ideazione e la verifica di un metodo che potesse garantire il collegamento meccanico fra i due MEMS di seconda generazione. Sono state affrontate e testate due tecniche: la prima prevedeva la realizzazione di un collegamento meccanico mediante wire bonding, la seconda mediante fibra di carbonio. E' stata ipotizzata anche una terza possibilità di collegamento mediante fibra di vetro, ricavata o da un tessuto per materiali compositi o da un capillare di vetro opportunamente tirato con puller a filamento riscaldato; tale fibra avrebbe però causato problemi in fase di rilascio, dato l'attacco selettivo dei materiali a base di silice da parte dell'acido fluoridrico.

4.2.1 Collegamento mediante wire bonding

La prima soluzione ipotizzata e testata è consistita nel realizzare un collegamento meccanico mediante wire bonding, analogamente a quanto si esegue per il collegamento elettrico fra MEMS e chip carrier. Le due principali ipotesi da verificare erano:

- la non deformabilità del filo in fase di trazione
- la resistenza del legame adesivo fra filo e piazzola

Per quanto riguarda la prima verifica, una semplice valutazione ha portato alla conclusione che le deformazioni che intervengono nel filo, conseguentemente all'applicazione di una sollecitazione di trazione mediante l'attuatore MEMS, sono irrilevanti rispetto agli spostamenti necessari per le prove. Utilizzando infatti un filo d'oro di diametro 25 micron e Modulo di Young pari a 78 GPa, la forza esercitata dall'attuatore, approssimabile intorno ai 50 μN , porta ad una sollecitazione sul filo pari a

$$\sigma = \frac{F}{S} = \frac{50 \cdot 10^{-6}}{12.5^2 \cdot 10^{-6} \pi} \approx 0,1 \text{MPa} \quad (4.1)$$

La deformazione è quindi pari a circa

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} = \frac{0,1}{78 \cdot 10^3} = 1,3 \cdot 10^{-6} \quad (4.1)$$

Per un filo di lunghezza 5 mm, quale può essere la lunghezza per l'applicazione descritta, la deformazione risulta essere pari a:

$$\Delta l = \varepsilon \cdot l = 1,3 \cdot 10^{-6} \cdot 5 \cdot 10^{-3} = 6,5nm \quad (4.1)$$

valore certamente accettabile ed adeguato alla prova.

Per quanto riguarda la seconda ipotesi, questa non ha avuto bisogno di verifiche dal momento che si era già potuto osservare sperimentalmente, effettuando microsaldature, che, in caso di rottura, la zona di cedimento non interessava il legame adesivo fra pad e filo, bensì il filo stesso. Avendo verificato che le forze in gioco sono tali da non deformare il filo, non vi erano quindi dubbi sulla tenuta del legame adesivo fra piazzola e filo.

I MEMS sono stati incollati alla distanza di qualche millimetro su di un chip carrier. Le microsaldature ad ultrasuoni sono state eseguite mediante un ball bonder (4124 Manual Gold ball bonder, K&S) effettuando il primo bonding sul pad collegato alla piattaforma ed il secondo sul pad collegato all'attuatore (figura 4.5 a). I risultati non hanno dato gli esiti sperati: il primo bonding, con una curvatura piuttosto accentuata al fine di evitare un *loop* troppo ampio del filo, deformabile in fase di trazione, ha nella maggior parte dei casi portato alla rottura delle molle ed al sollevamento della piattaforma deputata al posizionamento della cellula. In figura 4.5 (b) si evidenzia uno dei pochi risultati positivi in cui rispettivamente piattaforma e piazzola del motore sono in posizione corretta anche dopo il rilascio. E' possibile notare, tuttavia, la rottura delle molle del motore.

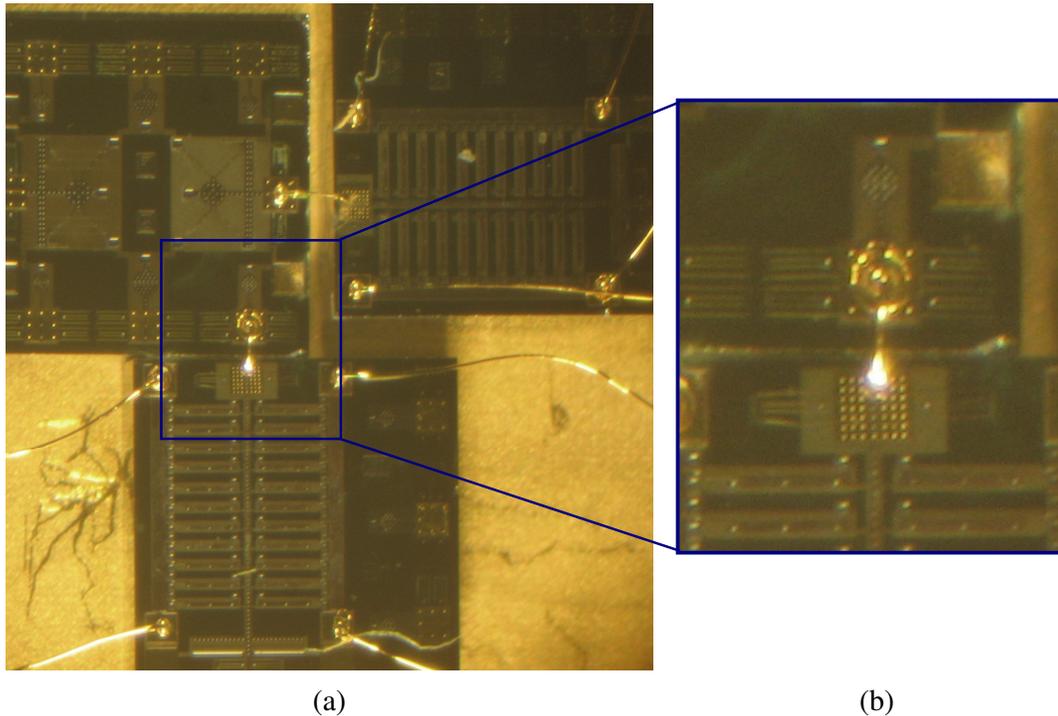


Fig. 4.5 Collegamento mediante wire bonding: (a) immagine d'insieme; (b) dettaglio

4.2.2 *Collegamento mediante fibra di carbonio*

A causa degli insuccessi ottenuti nella realizzazione del collegamento meccanico mediante wire bonding, si è cercata una seconda soluzione che prevedesse l'impiego di un componente di dimensioni microscopiche, di resistenza adeguata ed ancorabile ai pad del MEMS. Si è quindi optato per l'utilizzo di una fibra di carbonio, ricavata da un normale tessuto per materiali compositi. Sono state ideate due possibilità di collegamento della fibra di carbonio ai pad: mediante wire bonding e mediante fotopolimerizzazione locale di un adesivo.

4.2.2.1 *Adesione della fibra mediante bonding d'oro*

La tecnica prevede la realizzazione del collegamento meccanico fra i due MEMS di seconda generazione mediante una fibra di carbonio legata alle piazzole tramite wire bonding. Analogamente a quanto descritto al paragrafo precedente, i MEMS sono stati incollati alla distanza di qualche millimetro su di un chip carrier. Da un normale tessuto

per materiali compositi, si sono poi ricavate delle fibre unitarie di lunghezza pari a circa 5mm. Una di queste è stata posizionata sui MEMS utilizzando un filo di rame di diametro 200 micron, allineata secondo la direzione di movimentazione del sistema e posizionata sopra ai due pad da legare. E' stato così effettuato un bonding su entrambe le piazzole: in entrambi i casi è risultato conveniente effettuare il primo bonding; il secondo è stato bypassato mediante l'operazione di reset che prevede il taglio del filo dopo il primo bonding. La tecnica ha dato risultati soddisfacenti anche dopo il rilascio (fig. 4.6 a), consentendo così il superamento dei problemi riscontrati con il bonding interamente d'oro che portava nella maggior parte dei casi alla rottura delle strutture di polisilicio. In pochi casi, causa la ridottissima sezione delle fibre di carbonio, circa dieci micron, si è verificata la rottura della fibra (figura 4.5 b).

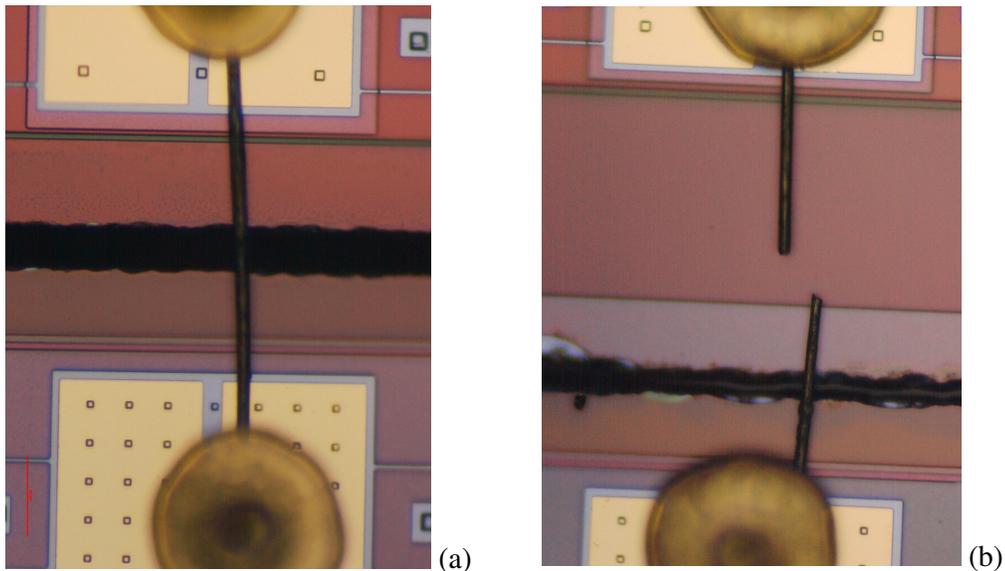


Fig. 4.5 Collegamento mediante fibra di carbonio: (a) fibra intatta; (b) fibra spezzata.

4.2.2.2 Adesione della fibra mediante adesivo

Dato il successo della prima soluzione testata, non sono state effettuate prove per verificare la realizzabilità dell'adesione fibra-pad mediante fotopolimerizzazione locale di un adesivo, sicuramente più onerosa in termini di tempo e meno efficace in termini forza di adesione. Tuttavia, se ne fa menzione dal momento che tale tecnica può risultare utile qualora debbano essere collegati dei MEMS già rilasciati, che non si possono post-processare mediante wire bonding (effettuabile solo su componenti fisse quali pad e piazzole ancorate all'ossido).

4.3 Collegamento elettrico dei MEMS

Per effettuare la connessione elettrica dei dispositivi MEMS ad un chip carrier di dimensioni macroscopiche si utilizza tipicamente uno strumento definito *wire bonder*. Il *wire bonding* è sostanzialmente un processo di saldatura in fase solida: due materiali metallici, tipicamente d'oro (un filo di dimensioni microscopiche ed un pad del MEMS) sono portati in stretto contatto; l'energia fornita dall'esterno promuove l'attivazione di fenomeni quali condivisione elettronica e interdiffusione di atomi tra le due superfici che portano alla formazione della connessione [9].

A seconda dell'agente formatore del legame, calore o energia ultrasonica, il processo può essere condotto in tre modi differenti: *thermocompression bonding*, *ultrasonic bonding* e *thermosonic bonding*. Altro particolare caratterizzante il processo, è la tipologia di connessione tra filo e piattaforma del chip, che può assumere essenzialmente due configurazioni a seconda dello strumento utilizzato: *ball bonding* e *wedge bonding*. La tecnica attualmente più utilizzata, ed anche la più veloce, è la prima: un filo viene fatto passare attraverso un capillare; una piccola porzione di questo viene fatta fondere, ed estesa così al di sotto del capillare, mediante un sistema di *electronic-flame-off*. Quando il materiale del filo solidifica, la tensione superficiale del metallo fuso porta alla formazione di una bolla. La bolla viene pressata sulla superficie di legame con forza sufficiente da causarne la deformazione plastica e l'interdiffusione atomica che assicura lo stretto contatto fra le due superfici metalliche.

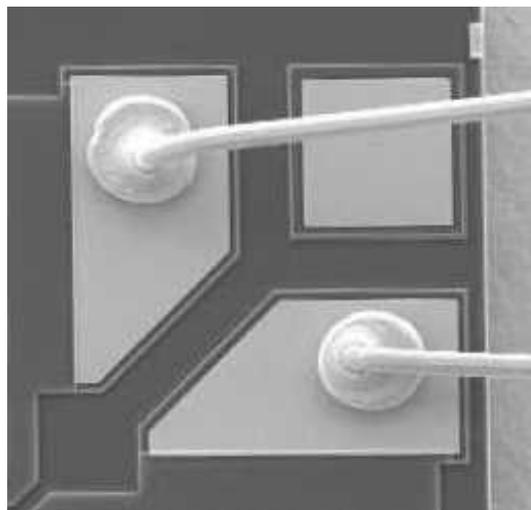


Fig. 4.6 Collegamento elettrico realizzato mediante ball bonding.

La seconda tipologia di configurazione è il *wedge bonding*: in questo secondo caso, la connessione elettrica viene realizzata mediante un *tool* di materiale ceramico, dalla caratteristica forma a cuneo, da cui deriva il nome della tecnica.

Data la frequenza di utilizzo dello strumento, si è reso necessario l'acquisto dello stesso: dato il costo relativamente oneroso, si è optato per l'acquisto di uno strumento usato (4124 Manual Gold ball bonder, K&S), illustrato in figura 4.7.



Fig. 4.7 Ball bonder.

Bibliografia

- [1] Freshney, RI (2000). Culture of animals cells: a macula of basic technique, 4th ed., Wiley-Liss, NY.
- [2] Kuschel, C, H Steuer, AN Maurer, B Kanzok, R Stoop and B Angres (2006). Cell adhesion profiling using extracellular matrix protein microarrays. *Biotechniques*, 40:523 531.
- [3] Lee and Mrksich, (2002). *Trends Biotech.*, 20 S14.

- [4] Lim H, D Kim, W Lee, Y Park and K Lee (2007). Production of protein microarrays for cell culture using electrostatic deposition. *Sensor and Actuators A: Physical*, 139 124-130.
- [5] Nelson, CM and CS Chen, Engineering cell adhesion for applications in biotechnology. www.seas.upenn.edu/~chenlab/pdf/29_NelsonCET_MS.pdf
- [6] Roberts C, CS Chen, M Mrksich, V Martichonok, DE Ingberg, GM Whitesides (1998). *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6548.
- [7] Schwartz, MA, Schaller MD and Ginsberg MH, (1995). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11 549.
- [8] Serrell, DB, TL Oreskovic, AJ Slifka, RL Mahajan, DS Finch, (2007). A uniaxial bioMEMS device for quantitative force-displacement measurements. *Biomed Microdevices*, 9(2):267-75.
- [9] Antonioli F (2004). Progettazione e caratterizzazione di un biosensore MEMS. Tesi di Laurea, Università di Trieste.

Capito 5.

Caratterizzazione dei dispositivi

Peace cannot be achieved through violence,
it can only be attained through understanding
Albert Einstein

Il presente capitolo descrive la caratterizzazione elettromeccanica dei diversi dispositivi progettati e realizzati mediante il processo PolyMUMPs, al fine di determinare le curve caratteristiche potenziale applicato - corrente e potenziale applicato - spostamento per ciascun MEMS.

5.1 MEMS di prima generazione

5.1.1 MEMS *biassiale con attuatore comb drive*

In figura 5.1 si illustra una foto al microscopio ottico (obiettivo 5x) del MEMS con piattaforma biassiale ed attuatore *comb drive* progettato dall'Ing. Nicola Scuur.

La caratterizzazione è stata condotta dallo stesso Ing. Nicola Scuur, per cui non si riporta la completa descrizione del set-up e dei risultati, ma si elencano solamente i risultati più importanti, utili al proseguo della trattazione. La caratterizzazione elettromeccanica è stata condotta posizionando il dispositivo, precedentemente rilasciato in HF e connesso elettricamente ad un chip carrier, sullo stage di un microscopio ottico a riflessione dotato di fotocamera digitale. Le prove sono state eseguite applicando un potenziale crescente da 0 a 100 V mediante un DC power supply, acquisendo un'immagine ogni 10V. Le

distanze fra le punte opposte della piattaforma ai diversi potenziali applicati sono state calcolate a partire dalle micrografie mediante un programma d'analisi d'immagine commerciale (Matlab® Image Processing toolbox).

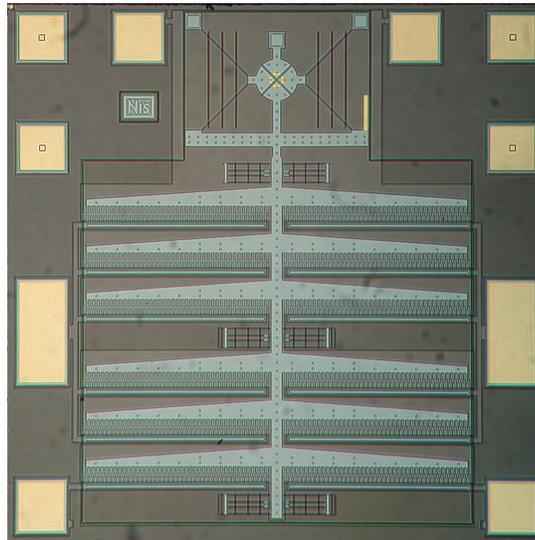


Fig. 5.1 foto al microscopio ottico del MEMS biassiale con attuatore comb drive

Le prove hanno confermato la corretta progettazione della piattaforma biassiale: le punte dei quattro quadranti si muovevano lungo l'asse x e y della stesa entità. Lo spostamento massimo che si è ottenuto è stato di circa $3.4 \mu\text{m}$ con un potenziale applicato pari a 100V (Scuor *et al.*, 2006).

5.1.2 MEMS biassiale con attuatore termico

Materiali e metodi

In figura 5.2 si riporta l'immagine acquisita al Microscopio Elettronico a Scansione del MEMS con piattaforma biassiale ed attuatore termico. Analogamente al dispositivo precedente, i test di caratterizzazione sono stati condotti posizionando il MEMS, precedentemente rilasciato in HF e connesso elettricamente ad un chip carrier, sullo stage di un microscopio ottico (Eclipse 50i, Nikon) dotato di fotocamera digitale (Digital Sight DS-2MV, Nikon). Il dispositivo è stato attuato elettricamente applicando potenziali crescenti, da 1 a 20 V, mediante un DC power supply (62006P-300-8, Chroma) e registrando la corrente passante mediante un amperometro (DM 102 Plus, Digimaster).

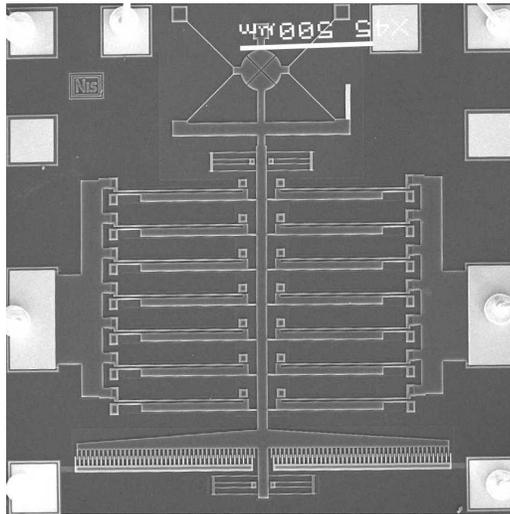


Fig. 5.2 Immagine SEM del MEMS biassiale con attuatore termico

Risultati

Il grafici seguenti riportano le curve caratteristiche potenziale – corrente (Fig. 5.3) e potenziale – spostamento (Fig. 5.4).

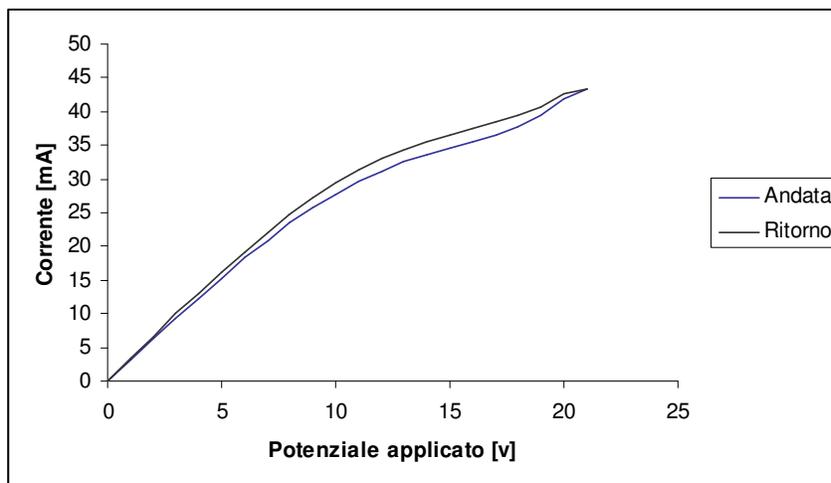


Fig. 5.3 Curva caratteristica potenziale - corrente

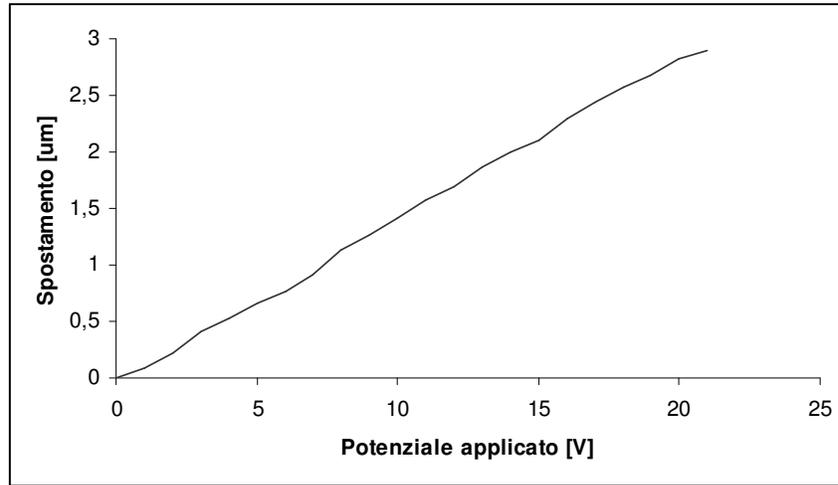


Fig. 5.4 Curva caratteristica potenziale – spostamento

Dal grafico in figura 5.3 è possibile notare come la resistenza del sistema si mantenga pressoché costante per bassi potenziali. Al crescere del potenziale applicato, e quindi dell'intensità della corrente circolante, assumendo in prima approssimazione che la resistività del polisilicio abbia un coefficiente di temperatura lineare α_r (Yang, 2002), la resistività diventa funzione della temperatura secondo l'equazione seguente:

$$\rho(T) = \rho_0[1 + \alpha_r(T - T_0)] \quad (5.1)$$

dove ρ e ρ_0 rappresentano la resistività elettrica del polisilicio alla temperatura T e T_0 rispettivamente, α_r rappresenta il coefficiente di temperatura resistività del polisilicio e T e T_0 rappresentano rispettivamente le temperature variabile ed ambiente in gradi Kelvin del sistema. E' possibile, in questo modo, dare una stima della temperatura media raggiunta per ogni valore del potenziale applicato a partire dai dati di resistenza estrapolabili dal grafico in figura 5.3. Da esso infatti si può ricavare una stima della resistenza dell'intero sistema nel tratto lineare pari a circa 320 Ohm. Quando il potenziale applicato raggiunge i 15 V, la resistenza complessiva è pari a circa 470 Ohm.

Dalla 5.1 si ricava allora:

$$T = (\rho/\rho_0 - 1 + \alpha_r T_0) / \alpha_r = 700K \quad (5.2)$$

che può essere considerata una stima della temperatura media raggiunta dal dispositivo. Per un'analisi dettagliata del riscaldamento sull'attuatore bimorfo si rimanda al paragrafo successivo di confronto dei risultati sperimentali con analisi numeriche ad elementi finiti. Si richiama infine in questa sede uno degli argomenti previsti tra gli sviluppi futuri della presente tesi di dottorato, ovvero un'analisi dettagliata della distribuzione di temperatura sugli attuatori termici mediante spettroscopia Raman (Serrano *et al.*, 2006).

Analizzando il grafico in figura 5.4 è possibile osservare come lo spostamento cresca approssimativamente in maniera lineare con il potenziale applicato: il massimo spostamento ottenuto con il motore termico è di circa 2,9 micron con un potenziale applicato pari a 21V. Anche nel presente caso, com'è facilmente intuibile, è stata rispettata la simmetria negli spostamenti dei quattro quadranti in x e y, garantendo allungamenti sostanzialmente identici nelle due direzioni.

La figura 5.5 riporta la configurazione di un attuatore termico quando il potenziale applicato è pari a 0 V (a) e a 20 V (b). La figura 5.6 mostra invece i quattro quadranti della piattaforma quando il potenziale applicato è pari a 0 V (a) e a 20 V (b).

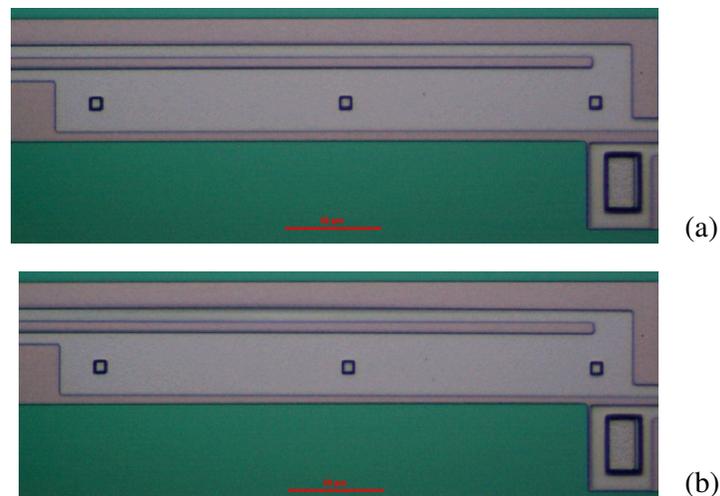


Fig. 5.5 Attuatore termico: (a) potenziale applicato 0V; (b) potenziale applicato 20V

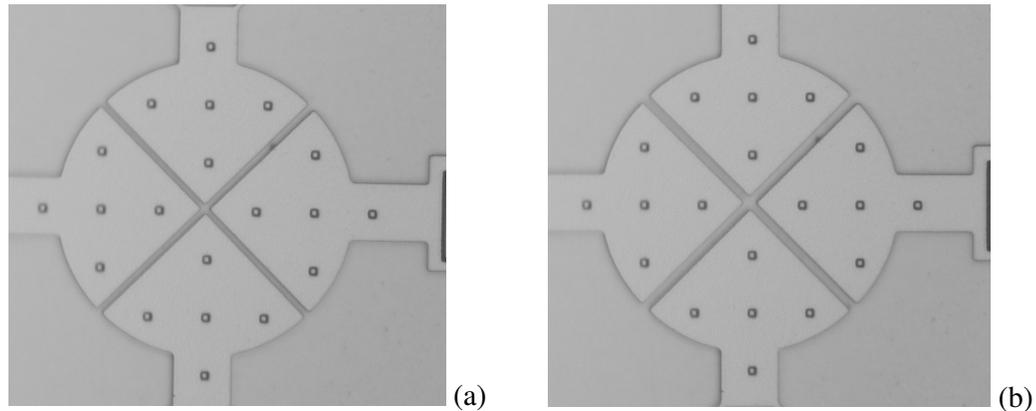
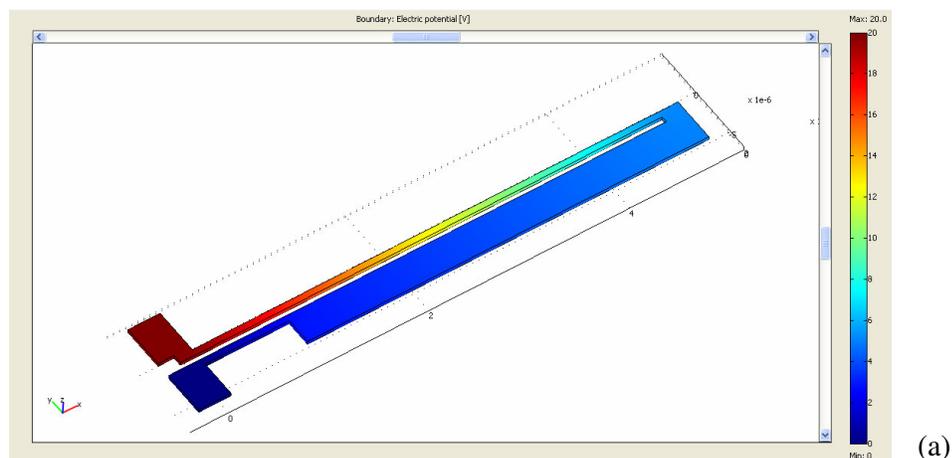


Fig. 5.6 Piattaforma: (a) potenziale applicato 0V; (b) potenziale applicato 20V

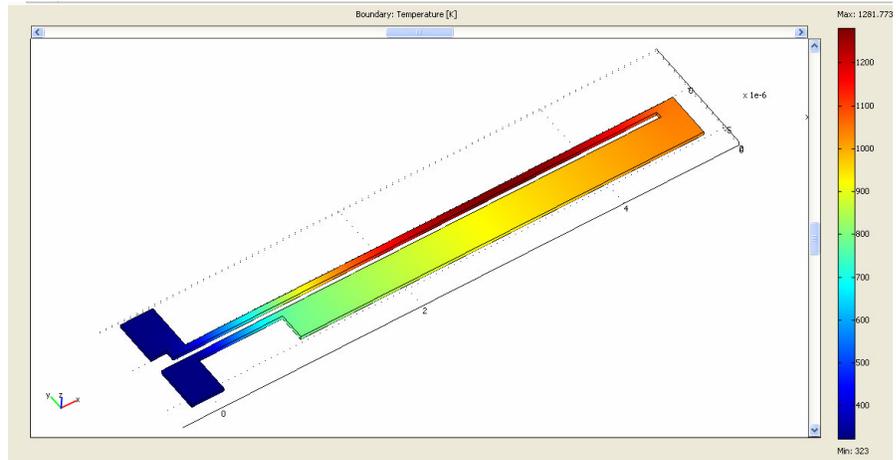
Confronto con simulazioni a elementi finiti

Si riporta solamente per il MEMS biassiale con attuatori termici il confronto con i risultati ottenuti da Simulazioni a Elementi Finiti condotte con il programma COMSOL 3.2. In particolare, le simulazioni di seguito elencate sono state realizzate impiegando tre applicazioni del programma: dal modulo COMSOL Multiphysic, l'applicazione Heat Transfer by Conduction; dal modulo MEMS, le applicazioni Solid Strain-Stress e Conductive Media DC. Per la modellizzazione del materiale sono stati utilizzati dati di letteratura (Atre, 2005; PolyMUMPs FAQs).

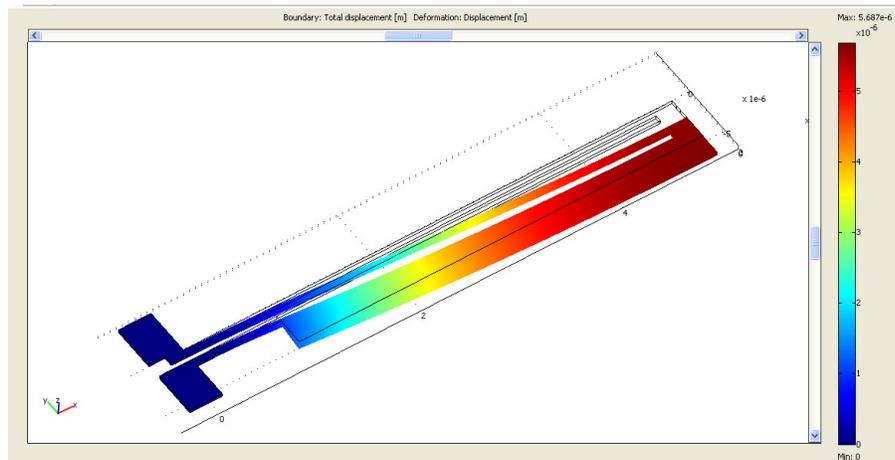
Si riporta in figura 5.7 la situazione che simula l'applicazione di un potenziale pari a 20V.



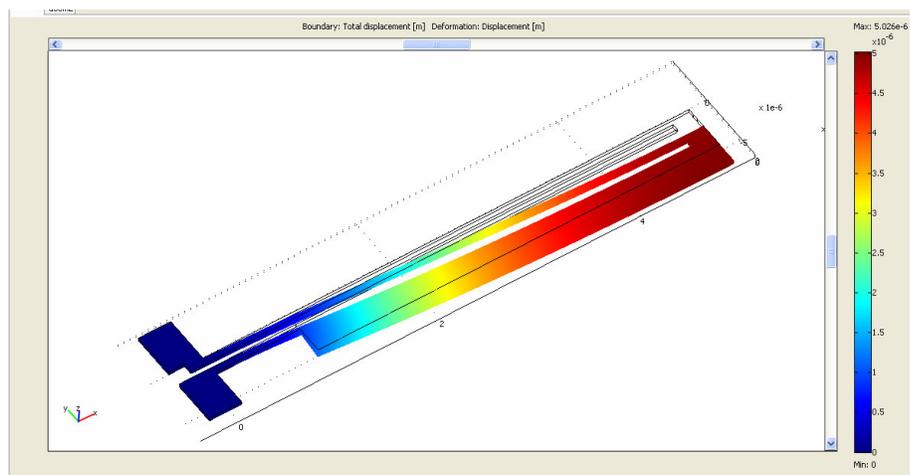
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 5.7 Attuatore termico: (a) potenziale applicato; (b) temperatura raggiunta; (c) deflessione; (d) deflessione con molle

La figura 5.7 (a) riporta l'andamento del potenziale quando si imposta una condizione al contorno pari a 20 V sul pad connesso al braccio caldo e a 0 V sul pad del braccio freddo. La simulazione è stata realizzata impiegando l'applicazione Heat Transfer by Conduction: sono state inserite le caratteristiche geometriche dell'attuatore come da progetto L-EDIT e le proprietà del materiale indicate da MEMSCAP per il processo PolyMUMPS del polisilicio. La figura 5.7 (b) riporta l'andamento della temperatura quando si simula l'applicazione di un potenziale di 20 V. Per questo step è stata impiegata l'applicazione Heat Transfer by Conduction, ricavando i dati di scambio termico da letteratura. E' possibile osservare come la temperatura massima raggiunta sul braccio caldo sia prossima ai 1000°C. Le figure 5.7 (c) e (d) riportano la configurazione finale del sistema in cui si valutano gli effetti meccanici conseguenti al riscaldamento del materiale. Le analisi sono state condotte utilizzando l'applicazione Solid Strain-Stress, vincolando la struttura nelle tre direzioni dello spazio in corrispondenza dei pad e lungo l'asse x e z in corrispondenza dell'estremità libera dell'attuatore (c). Il caso (d) si differenzia rispetto al precedente perché, oltre ai vincoli precedenti, all'estremità libera vede applicata una forza dipendente dallo spostamento, o meglio un vincolo cedevole di costante elastica pari a 0,43 N/m (risultato di 4 molle divise su 14 attuatori), che simula l'accresciuta rigidità del sistema dovuta all'impiego di molle. Nel caso (c) lo spostamento massimo è pari a 5,68 μm ; in (d) esso assume un valore pari a 5,02 μm .

I risultati numerici e sperimentali non sono pienamente in accordo: il motivo di ciò è da attribuire principalmente allo spostamento verticale che subisce la struttura quando attuata sperimentalmente: tale spostamento lungo z è osservabile come perdita del fuoco analizzando il sistema al microscopio ottico. La seconda ragione è dovuta alla frizione fra struttura e substrato in Poly0: questa è enormemente ridotta grazie all'impiego di dimple; tuttavia non può essere considerata trascurabile.

Si riporta infine per completezza l'analisi strutturale dell'attuatore per definirne la rigidità (figura 5.8). L'immagine si riferisce ad un'analisi strutturale eseguita con l'applicazione Solid Strain-Stress in cui viene applicato puntualmente un carico di 2 μN suddiviso sui due angoli al vertice all'estremità libera dell'attuatore. Lo spostamento che ne risulta è pari a circa 0.5 μm ; di conseguenza la rigidità di ciascun attuatore è pari a 11,2 N/m.

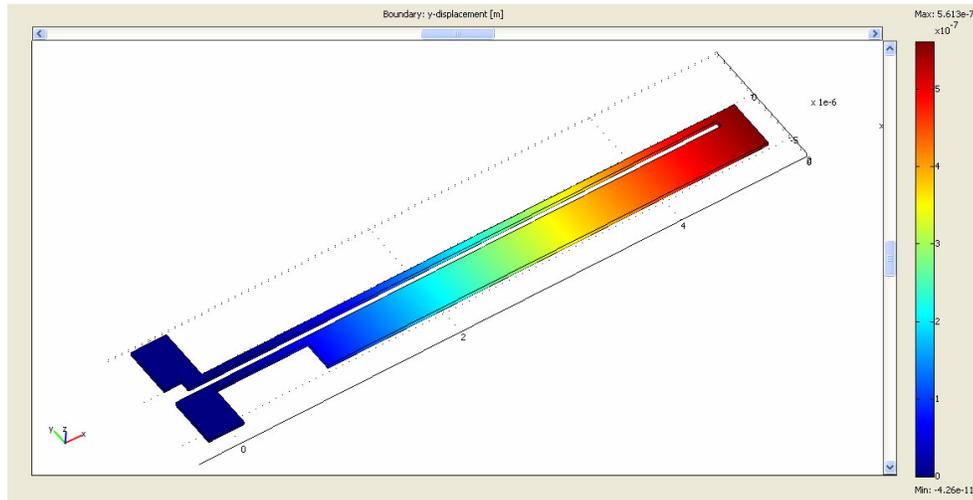


Fig. 5.8 MEMS pluriassiale con attuatori termici

5.1.3 MEMS pluriassiale con attuatore termico

Materiali e metodi

Il MEMS con piazzola centrale suddivisa in 12 segmenti e dotata di spostamento piano lungo sei direzioni è illustrato nell'immagine al microscopio elettronico a scansione in figura 5.9. Il dispositivo è costituito da quattro bancate di otto motori termici, collegate ciascuna ad un segmento della piattaforma centrale. Tale MEMS è l'unico che si è potuto caratterizzare in tre ambienti differenti: nella camera a vuoto di un SEM, in aria ed in ambiente liquido. I test di caratterizzazione sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Ingegneria Meccanica della Colorado University di Boulder, CO. Si sono così potute effettuare, oltre alle tradizionali prove in aria, anche prove in vuoto utilizzando un FESEM (JSM-7401F, Jeol, Giappone), acronimo per Field-Emission Scanning Electron Microscope, dotato di feedthrough elettrico, disponibile presso il Nanomaterials Characterization Facility della stessa università.

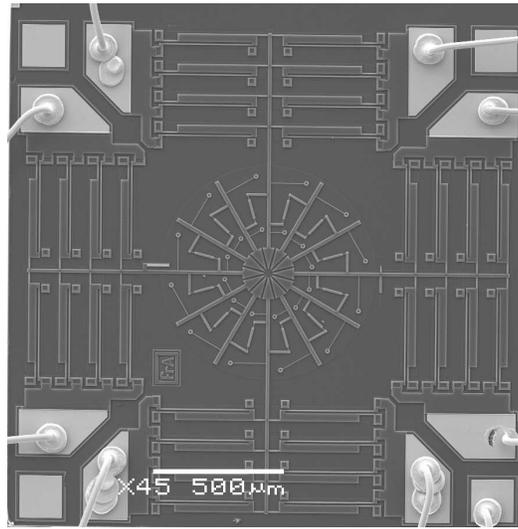


Fig. 5.9 MEMS pluriassiale con attuatori termici

Analogamente ai casi precedenti, la caratterizzazione in aria è stata eseguita posizionando il dispositivo sullo stage del microscopio ottico dotato di fotocamera digitale; analogo set-up è stato utilizzato per lo studio in ambiente liquido, depositando una goccia d'acqua deionizzata degasata sul MEMS e ricoprendo poi il tutto con un vetrino coprioggetto.

La caratterizzazione elettromeccanica è stata eseguita applicando un potenziale crescente al dispositivo mediante un DC power supply e rilevando la corrente passante mediante un tester. Le distanze fra le parti in movimento sono state misurate nel primo caso utilizzando le utility di misura del microscopio elettronico; nel secondo e terzo caso analizzando le immagini registrate mediante la fotocamera digitale con un programma d'analisi d'immagine (Image Pro Plus 5.0). Non avendo a disposizione un generatore di funzioni di potenza sufficiente, la caratterizzazione in acqua è stata condotta in corrente continua fino ad un potenziale di circa 2 V, in corrispondenza del quale ha avuto inizio l'elettrolisi dell'acqua con il conseguente sviluppo di bolle di idrogeno ed ossigeno.

Risultati

I grafici seguenti riportano le curve potenziale applicato - corrente (Fig. 5.10) e potenziale applicato - spostamento (Fig.5.11).

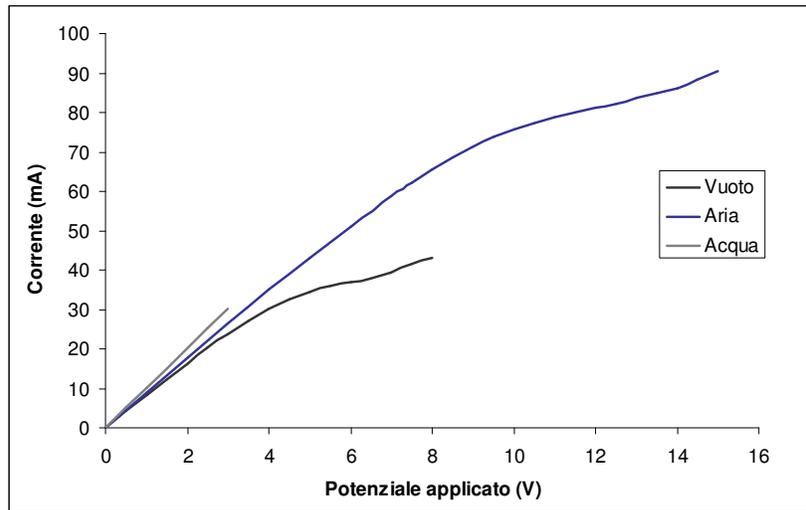


Fig. 5.10 Caratteristica potenziale-corrente nei tre ambienti

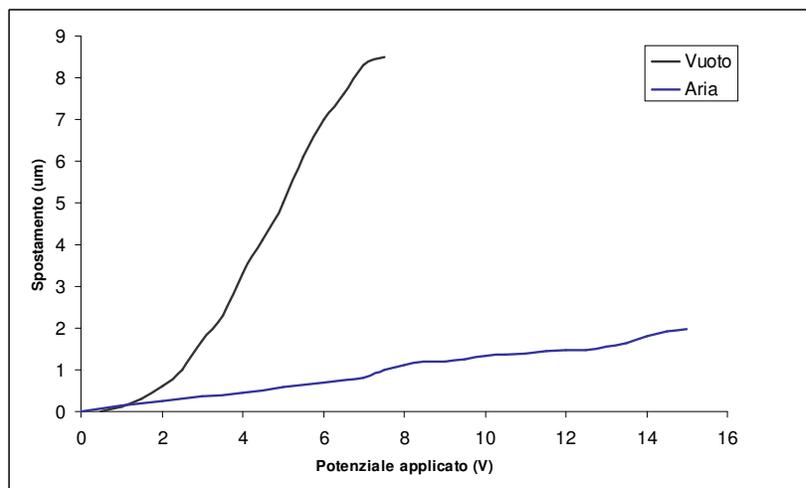


Fig. 5.11 Curve potenziale-spostamento n vuoto ed in aria

E' possibile innanzitutto osservare nel grafico 5.10 come la resistenza del sistema sia funzione dell'ambiente operativo: essa ha un andamento decrescente passando dal vuoto, all'aria, all'acqua. In particolare, la resistenza del sistema, a bassi potenziali applicati, è pressoché simile nei tre ambienti di lavoro. Essa però si differenzia molto all'aumentare del potenziale applicato a causa dal differente riscaldamento, o meglio, del differente raffreddamento, che subiscono le strutture nei tre ambienti: come accennato al capitolo 3 a proposito dell'operatività dei dispositivi MEMS in acqua, se l'attuatore bimorfo lavora in ambienti in cui l'alta conduttività termica del fluido che lo circonda porta un veloce

smaltimento del surriscaldamento causato dal passaggio di corrente, si abbassa la resistenza del sistema e si inibisce il verificarsi di qualsiasi differenza di temperatura significativa tra le due travi spaziate di pochi micron. Di conseguenza viene ridotta l'efficienza del sistema e sono richiesti maggiori incrementi di potenza per raggiungere la stessa temperatura e quindi deflessione che possono essere ottenute in aria o, ancor più, in vuoto.

In figura 5.12 si riportano le immagini al SEM ed al microscopio ottico relative al dispositivo MEMS attuato in vuoto (a e b) ed in aria (c e d). Le foto evidenziano il più ampio allungamento degli spicchi della piattaforma quando il dispositivo lavora in vuoto piuttosto che in aria, pari rispettivamente a 8,5 e 1,97 μm .

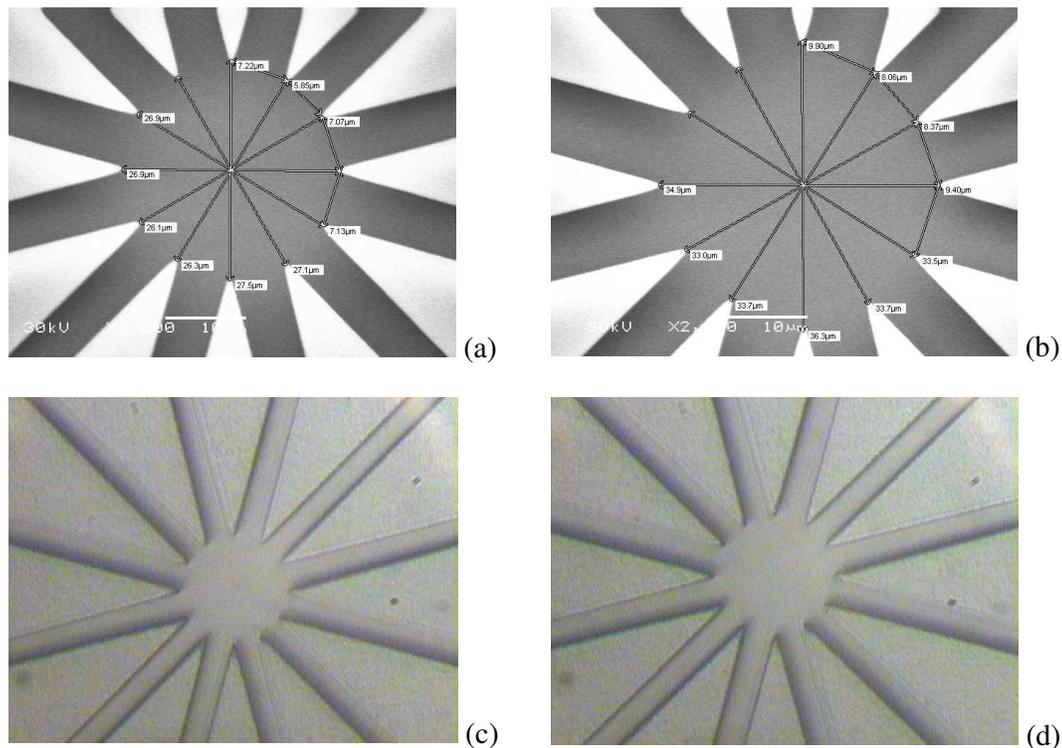


Fig. 5.12 Caratterizzazione: in vuoto a) spostamento nullo; b) massimo spostamento; in aria c) spostamento nullo; d) massimo spostamento

Si è proceduto in maniera analoga alla caratterizzazione dei dispositivi con piazzola rielaborata al fine diminuire lo spazio vuoto centrale. Data la stretta corrispondenza con i risultati precedenti sia in termini elettrici che meccanici, si omette la descrizione completa dei risultati delle prove. Si riporta solamente l'immagine acquisita al Microscopio Elettronico a Scansione delle due strutture, prima (Fig. 5.13 a) e dopo (Fig.

5.13 b) la rielaborazione, che dimostra la realizzazione fedele del progetto mediante il processo PolyMUMPs.

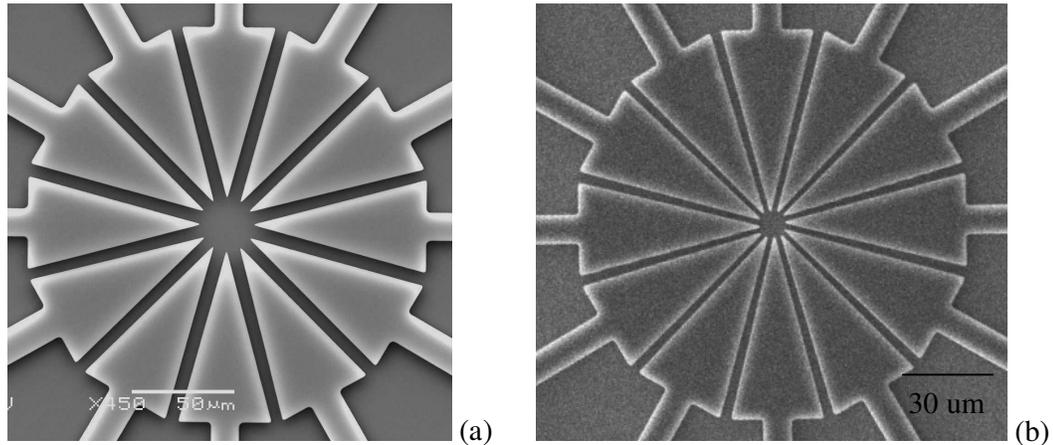


Fig. 5.13 Piattaforma pluriassiale iniziale (a) e rielaborata (b)

Anche nel presente caso, si è voluto dare una stima teorica delle temperature raggiunte dal sistema. Avendo a disposizione anche una caratterizzazione in vuoto, in cui si può ritenere che la potenza venga dissipata essenzialmente per irraggiamento, è possibile dare una stima più dettagliata delle variazioni di temperatura a partire dai dati di variazione delle resistenze del sistema.

Dalle misure di tensione e corrente, infatti, si possono ricavare i valori della resistenza elettrica $R=V/I$ e delle potenze elettriche $P=VI$ del sistema. Le coppie dei valori (R,P) , rappresentate graficamente in scala logaritmica, a partire da un certo valore della potenza, mostrano un andamento lineare. Il tratto lineare corrisponde ad una prevalenza dell'irraggiamento su tutti gli altri contributi di dissipazione della potenza elettrica in condizioni di equilibrio [3]. L'interpolazione dei punti $(\log R, \log P)$ fornisce una relazione di dipendenza del tipo:

$$\log P = m \log R + q \quad (5.3)$$

Dall'interpolazione dei dati sperimentali risultano per m e q dei valori rispettivamente pari a 2,62 e -3,45 (figura 5.14). Ponendo $K=10^q$ si ottiene

$$P = KR^m \quad (5.4)$$

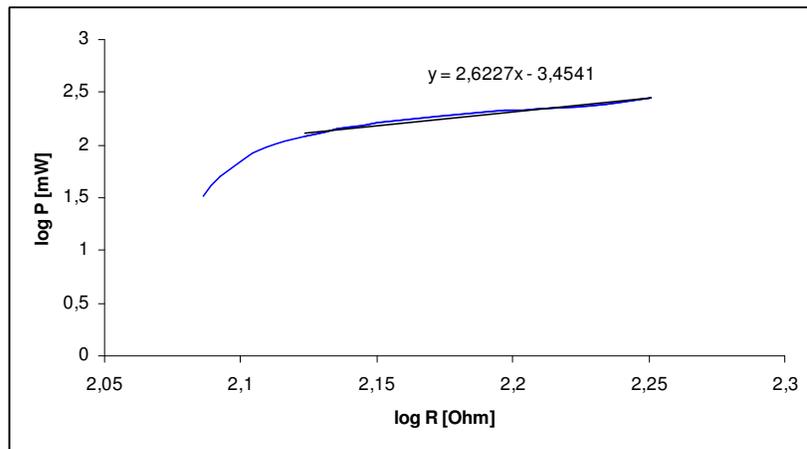


Fig. 5.14 Caratteristica Potenza – Resistenza per il sistema operante in vuoto

Il tratto lineare corrisponde ad una prevalenza dell'irraggiamento su tutti gli altri contributi di dissipazione della potenza elettrica fornita al sistema in condizioni di equilibrio. Si può assumere allora che:

$$P = VI = \epsilon\sigma A(T^4 - T_0^4) \quad (5.5)$$

E potendo generalmente ritenere $T^4 \gg T_0^4$

$$P = VI \approx \epsilon\sigma AT^4 \quad (5.6)$$

da cui

$$KR^m = \epsilon\sigma AT^4 \quad (5.7)$$

Assumendo dai dati sperimentali valori di resistenza pari a 120 Ohm a temperatura ambiente e 180 Ohm quando il potenziale applicato è pari a 7,5 V si ottiene una stima della temperatura media del sistema pari a 780 K.

5.2 MEMS di seconda generazione

5.2.1 Motori termici a 2 e a 4 serie di attuatori

Materiali e metodi

I due diversi motori termici sono stati caratterizzati presso il Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali dell'Università degli Studi di Trieste, operanti in aria e dapprima senza collegamento alle teste per l'accoglimento della singola cellula. Dopo aver condotto alcune prove preliminari, il risultato sembrava essere un mancato funzionamento dei motori termici: osservando al microscopio ottico il dispositivo attuato elettricamente, si osservava uno spostamento dei motori lungo l'asse z e non sul piano x-y. Un'attenta analisi del fenomeno ha portato a riconoscere la causa del fenomeno nell'insufficiente esposizione dell'ossido sacrificale all'acido fluoridrico al di sotto della piattaforma di circa 200x200 micron disposta per la creazione del collegamento fra i due MEMS: le linee guida del processo PolyMUMPs [2], infatti, riportano per la velocità di asportazione dell'ossido da parte dell'HF un valore pari a 10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$: ne segue che il normale lasso di tempo di 2-2,5 minuti dedicato all'attacco acido non può essere sufficiente alla completa liberazione della suddetta piattaforma. Dopo una serie di prove sperimentali condotte sottoponendo i dispositivi ad attacchi acidi per tempi crescenti (da 6 a 12 minuti), è stata determinata la tempistica adeguata, pari a 10 minuti, per la completa librazione delle strutture in polisilicio, in accordo con le linee guida fornite per il processo PolyMUMPs. I test di caratterizzazione sono stati condotti in maniera analoga a quelli descritti ai paragrafi precedenti: i MEMS sono stati rilasciati, connessi elettricamente ad un chip carrier e posizionati sullo stage di un microscopio ottico (Eclipse 50i, Nikon) dotato di fotocamera digitale (Digital Sight DS-2MV, Nikon). I dispositivi sono stati attuati elettricamente applicando potenziali crescenti, da 1 a 20 V, mediante un DC power supply (62006P-300-8, Chroma) e registrando la corrente passante mediante un amperometro (DM 102 Plus, Digimaster).

Risultati

Nelle figure 5.15 e 5.16 si riportano rispettivamente la curva caratteristiche potenziale - corrente e potenziale - spostamento per i due sistemi in esame.

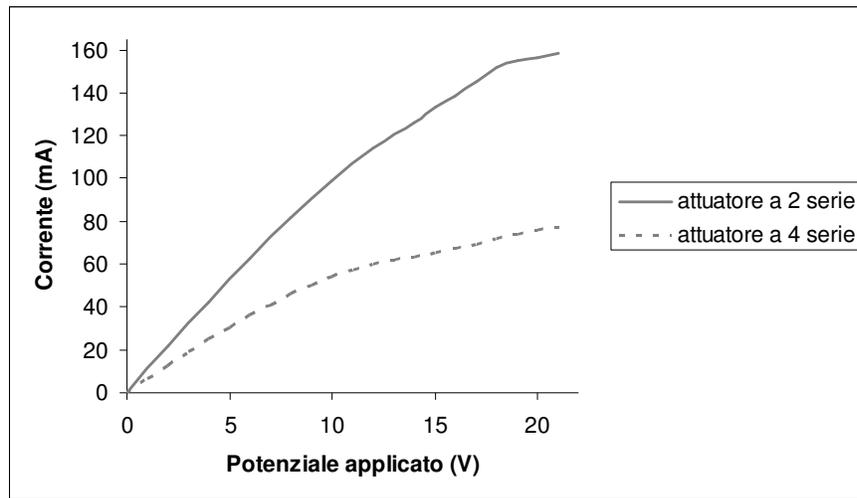


Fig. 5.15 Caratteristica potenziale-corrente per gli attuatori termici a 2 e a 4 serie

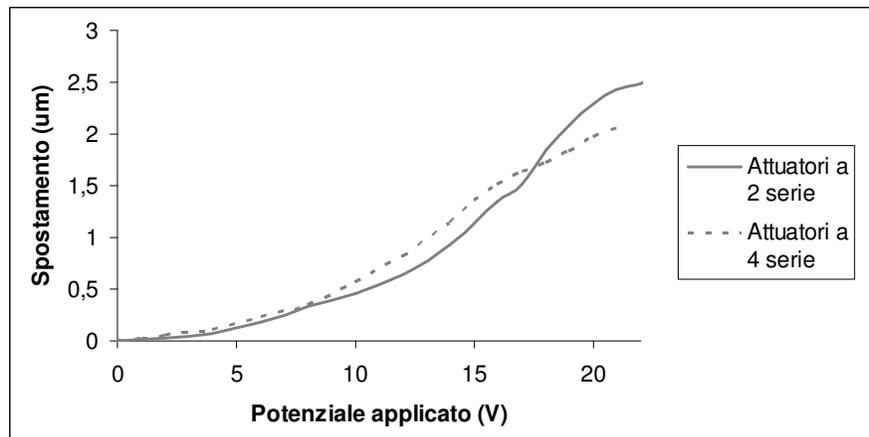


Fig. 5.16 Curve potenziale-spostamento per gli attuatori termici a 2 e a 4 serie

E' possibile innanzitutto notare la differenza di resistenza termica dei due dispositivi, rispettivamente 94 e 156 Ohm a bassa temperatura. In entrambi i casi è possibile osservare l'aumento della resistenza del sistema con la temperatura. Per quanto riguarda lo spostamento, il motore a 4 serie di attuatori raggiunge uno spostamento massimo di 2,67 micron quando applicato un potenziale pari a 24V. Il motore a due bancate, invece, raggiunge uno spostamento massimo pari a 2,06 µm quando viene applicato un potenziale pari a 21 V. Il guadagno ottenuto nello spostamento del motore a 4 bancate rispetto a quello ottenuto con il "due bancate" non è raddoppiato come previsto per due ragioni: la prima dovuta alla non ottimale circolazione della corrente nel sistema a

quattro bancate; la seconda dovuta al fatto che parte dell'efficienza del sistema viene dissipata con uno spostamento dell'intera struttura lungo l'asse z, osservabile al microscopio ottico come maggiore perdita del fuoco del motore a 4 bancate di attuatori rispetto a quello a 2 bancate.

5.2.2 Motore comb drive

Per quanto riguarda infine il motore comb drive del MEMS di seconda generazione illustrato in figura 5.17, sono state eseguite prove con diversi dispositivi, ma nessuno di questi ha mostrato segnali di funzionamento: anche con l'applicazione di elevati potenziali, pari a 130-150 V, non si è registrato alcun movimento della struttura. La causa è ascrivibile con buona probabilità alle maggiori dimensioni della piazzola per la creazione del collegamento meccanico con il secondo MEMS, che, oltre a richiedere tempi più lunghi di rilascio, può creare stiction (più sentita dagli attuatori comb drive piuttosto che dai termici) oltre che aumentare la frizione del sistema.

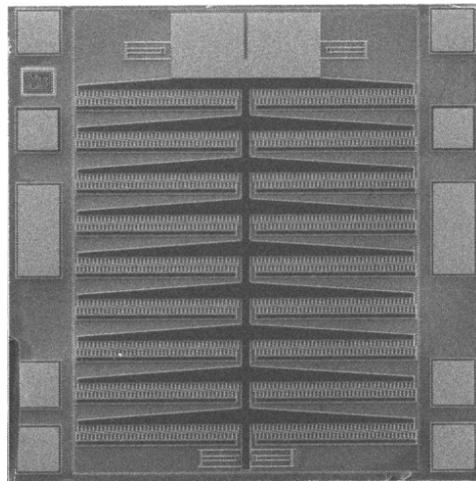


Fig. 5.17 Motore comb drive

Bibliografia

- [1] Antonioli F, S Maggiolino, P Gallina, N Scuor, R Mahajan and O Sbaizero (2008). A Novel MEMS Device for Single Cell Studies. *Proceedings of International Conference on MEMS And Nanotechnology*, in press.

- [2] Atre A (2005) Design Optimizaton of a Surface Micromachined Electro-Thermal Beam Flexure Polysilicon Actuator. *NSTI-Nanotech 2005*, Vol. 3.
- [3] <http://web.uniud.it/cird/SECIF/ottica/bici/emi4.htm>
- [4] PoluMUMPS FAQ, Revision 2.0, MEMSCAP (2004)
- [5] Scuor, N, P. Gallina, H.V. Panchawagh, R.L. Mahajan, O. Sbaizero and V. Sergio (2006). Design of a novel MEMS platform for the biaxial stimulation of living cells. *Biomed Microdevices*, 8:239-246.
- [6] Serrano JR, Phinney LM, Kearney SP (2006). Micro-Raman thermometry of thermal flexure actuators. *J. Micromech. Microeng*, 16 1128-1134.
- [7] Yang D (2002). Mechanical Design and Modeling of MEMS Thermal Actuators for F Applications. Master Thesis, University of Waterloo.

Capitolo 6.

Sperimentazione con cellule

Nature is playing with us,
why don't we try to play with it?
S.C.

Il presente capitolo descrive la fase conclusiva del lavoro di dottorato, ovvero la sperimentazione dei dispositivi con cellule viventi. Il capitolo si compone di un primo paragrafo in cui si descrive la realizzazione di un laboratorio per colture cellulari presso il Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali, seguito dalla descrizione della messa a punto della tecnica di manipolazione di singole cellule e la sperimentazione finale per la valutazione delle proprietà meccaniche di una singola cellula

6.1 Realizzazione di un laboratorio per colture cellulari

Proseguendo con la sperimentazione, si è resa evidente la necessità di dotarsi di un laboratorio per colture cellulari. L'alternativa era, infatti, rivolgersi ad un laboratorio esterno. Questa soluzione, tuttavia, non sarebbe risultato soddisfacente dal momento che tipicamente i laboratori di biologia cellulare

- non sono dotati di microscopi per l'osservazione dei campioni in riflessione, dato che l'osservazione di cellule in fiasche e petri si effettua normalmente con microscopi rovesciati a trasmissione;
- solitamente tali laboratori lavorano su popolazioni di cellule e non sono quindi dotati della strumentazione necessaria per la manipolazione di singole cellule;

- non dispongono, infine, della strumentazione necessaria per l'alimentazione elettrica dei dispositivi MEMS (power supply, generatori di funzione, tester, ...).

E' stato quindi deciso di allestire un piccolo laboratorio per colture cellulari presso lo stesso Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali. E' stata così individuata una stanza dotata di aspiratore in cui collocare la strumentazione necessaria, ovvero sostanzialmente un incubatore ed una cappa a flusso laminare.

Per quanto riguarda l'acquisto del primo, è stata fatta una scelta forse azzardata, ma risultata tuttavia vincente per diversi motivi. Gli incubatori biologici commerciali, infatti, garantiscono il controllo sia della temperatura che della percentuale di CO₂ nell'atmosfera (pari al 5% per la maggior parte delle cellule). La nostra scelta è invece ricaduta, per motivi essenzialmente economici, su di una normale stufa da laboratorio (Type M40-TB, Tecnovetro S.r.l., Monza), con il solo controllo della temperatura; la concentrazione desiderata di CO₂ si è potuta comunque ottenere utilizzando una bombola di CO₂ premiscelata al 5% con aria, facendo gorgogliare qualche bolla al secondo di miscela in un gorgogliatore contenente acqua milliQ. Normalmente invece, gli incubatori biologici utilizzano una bombola di CO₂ al 100%, la cui concentrazione all'interno dell'incubatore viene controllata da un sensore. Dal momento che l'incubatore non presentava una tenuta ottimale, si è scelto di inviare la miscela di aria e anidride carbonica all'interno di un contenitore semiermetico per uso alimentare (Fig. 6.1). In questo modo, la soluzione proposta ha fornito i seguenti vantaggi:

- notevole risparmio economico: la stufa ha un costo pari a circa un terzo di quello di un incubatore per colture cellulari
- possibilità di gestire nello stesso incubatore colture cellulari che richiedono differenti concentrazioni di CO₂ (i fibroblasti cardiaci ad esempio), aggiungendo un ulteriore contenitore collegato ad una bombola con la miscela d'aria/ CO₂ alla concentrazione desiderata
- minor rischio di contaminazione, dal momento che l'aria inviata nell'incubatore non viene ricavata dall'ambiente esterno, bensì viene inviata in condizioni sterili direttamente dalla bombola.

L'unico svantaggio, tuttavia irrilevante, è il ricambio più frequente della bombola. Utilizzando una bombola da 200 atm, la durata è comunque elevata, indicativamente un anno.



Fig. 6.1 Interno dell'incubatore

Il secondo strumento indispensabile in un laboratorio per colture cellulari è una cappa a flusso laminare.



Fig. 6.2 Cappa a flusso laminare verticale

E' stata quindi acquistata una cappa a flusso laminare verticale (Vertical 700, Asalair) dotata di lampada UV per la sterilizzazione (figura 6.2). In figura, all'interno della cappa sulla destra, si può inoltre osservare un pipettatore automatico (Pipet Aid, Gilson).

6.2 Manipolazione della singola cellula

Altra problematica affrontata, è stata la messa a punto di una tecnica efficace per la manipolazione di una singola cellula.

In letteratura esistono diversi sistemi e tecniche per la manipolazione, ovvero cattura e spostamento, della singola cellula: questi possono essere manipolatori elettromagnetici, che utilizzano particelle ferromagnetiche di dimensioni micrometriche movimentate mediante un magnete permanente (Gauthier and Piat, 2002); manipolatori elettrostatici, che intrappolano ed orientano la cellula lungo le linee di un campo elettrico per mezzo di un campo elettrostatico (Mizuno *et al.*, 1995); oppure manipolatori meccanici (Frohlich and Konig, 2000). La scelta è ricaduta su quest'ultima tipologia di micromanipolatori, meno dispendiosa sia in termini temporali che economici e comunque adeguata alle necessità. E' stato quindi acquistato un micromanipolatore meccanico, illustrato in figura 6.3 (NMN-21, Narishige, Giappone). Tale strumento è dotato di microviti per spostamenti grossolani (fino a 4 mm) e fini (minimo spostamento consentito pari a 1 micron) nelle tre direzioni dello spazio e di un supporto rotante su cui installare lo strumento di manipolazione.

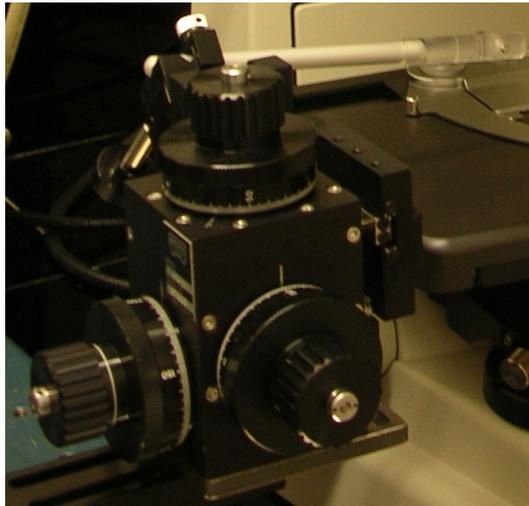


Fig. 6.3 Micromanipolatore meccanico

Per la “cattura” vera e propria della singola cellula sono stati utilizzati dei capillari di vetro, tubicini di 9 mm di lunghezza ed 1 e 2 mm di diametro rispettivamente interno ed esterno (mod. G-2, Narishige, Giappone), tirati mediante il puller (mod. PC-10,

Narishige, Giappone), illustrato in figura 6.4, a filamento riscaldante di tungsteno al fine di creare due punte di dimensioni micrometriche.



Fig. 6.4 Puller

Le punte si possono così montare sull'apposito sistema di afferraggio rotante del manipolatore e posizionare sotto l'obiettivo del microscopio (figura 6.5).

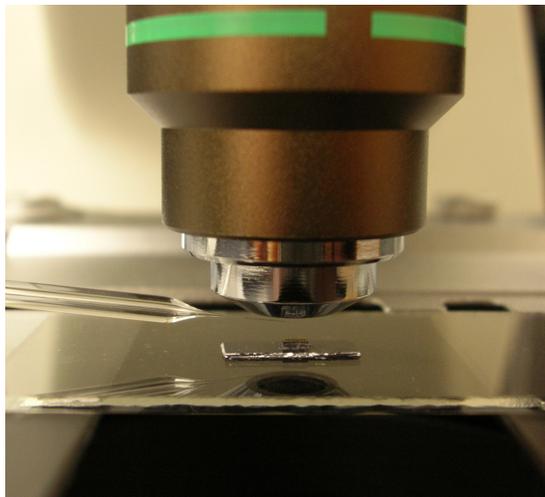


Fig. 6.5 Microcapillare di vetro in condizioni operative

In figura 6.6 è infine illustrato l'apparato di lavoro completo, in cui micromanipolatore e capillari vengono opportunamente posizionati in prossimità di un microscopio (Eclipse 50i, Nikon, Giappone) dotato di fotocamera digitale (Digital Sight DS-2MV, Nikon, Giappone).

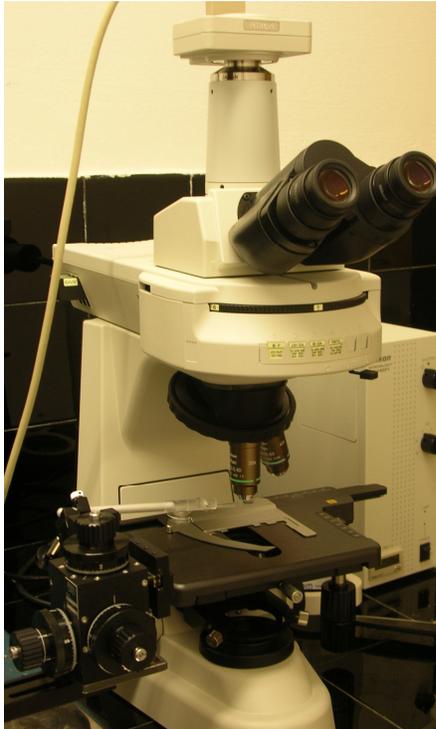


Fig. 6.6 Apparato di lavoro

In letteratura, una delle tecniche per la deposizione di una singola cellula su di un dispositivo prevede l'utilizzo di un Picospritzer, uno strumento in grado fornire impulsi di pressione per l'espulsione di volumi di liquido dal pico al nanolitro (Serrel *et al.*, 2007). Per evitare l'acquisto di un ulteriore strumento, si è tentato, con esito positivo, di operare con il solo micromanipolatore meccanico.

La tecnica messa a punto prevede la deposizione di una goccia di medium, contenente cellule in sospensione molto diluite, sul MEMS (Fig. 6.7 a). Muovendo il micromanipolatore, si porta la punta del capillare di vetro (Fig. 6.7 b) in prossimità di una cellula (Fig. 6.7 c), la quale aderisce spontaneamente al capillare di vetro idrofilico. In questo modo, con microspostamenti successivi, è possibile depositare una cellula al centro della piattaforma del MEMS (la fig. 6.7 d mostra un miocita), preventivamente funzionalizzata con proteine o con materiali biocompatibili.

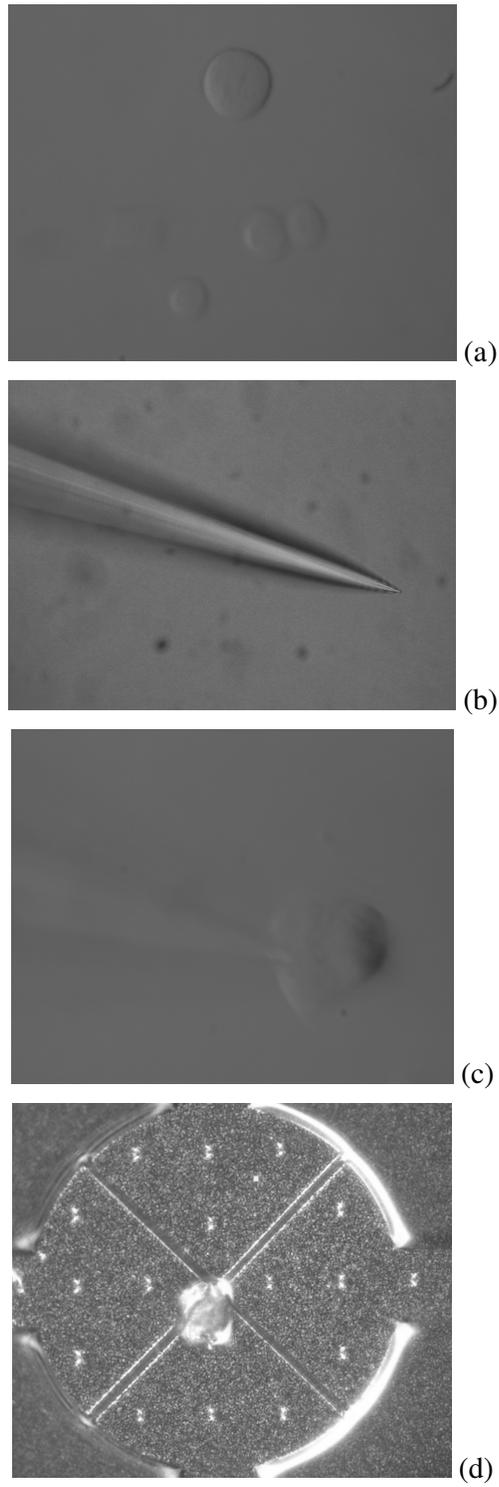


Fig. 6.7 Fasi per la manipolazione di una singola cellula

Dopo circa 15-20 minuti la cellula aderisce al substrato e crea su di esso una prima debole adesione. Il MEMS può quindi essere ricoperto di medium e deposto in incubatore per diverse ore, dalle 4 alle 48 ore a seconda delle cellule con cui si opera.

Dopo che la cellula si è appiattita sul substrato ed ha creato una buona adesione con esso, è possibile procedere con l'esecuzione delle prove.

6.3 Prove con cellule viventi

Prima dell'esecuzione delle prove vere e proprie con i dispositivi MEMS, sono state eseguite delle prove su cellule viventi utilizzando delle piattaforme non alimentate da motori termici od elettrostatici, bensì movimentate mediante il micromanipolatore stesso. Le prove sono consistite in una prima fase condotta in maniera analoga alla precedente, in cui sono state funzionalizzate diverse piattaforme con fibronectina, è stata depositata una cellula al centro di ciascuna piattaforma e lasciata aderire ed appiattirsi in incubatore per 24 ore nel caso dei fibroblasti, 48 ore nel caso dei miociti. Dopo aver lasciato trascorrere il tempo necessario alla corretta adesione della cellula, il dispositivo è stato posto sullo stage di un microscopio a fluorescenza. Utilizzando la punta di un capillare di vetro, ridotta a pochi micron di diametro mediante il puller, montato sul micromanipolatore, l'emidisco non ancorato della piattaforma è stato spostato di una decina di micron, deformando della stessa entità la cellula attaccata alla piattaforma. In figura 6.8 si riportano le immagini in luce visibile del sistema piazzola-miocita non deformato (a) e deformato mediante manipolazione esterna. In figura 6.8 (c) e (d) si riportano le immagini corrispondenti in fluorescenza, in cui la cellula è stata trattata con un marcatore fluorescente selettivo per gli ioni calcio. Si è voluto in questo modo evidenziare lo spostamento degli stessi ioni quando un miocita è soggetto a sollecitazione meccanica.

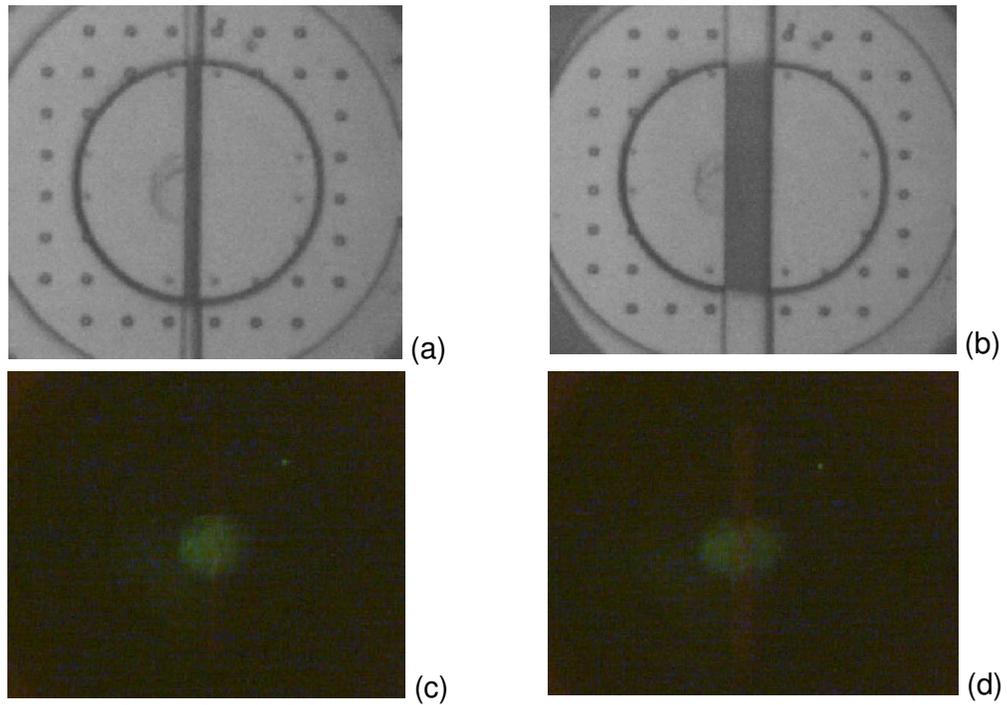


Fig. 6.8 Prove sperimentali su un singolo miocita; (a) cellula stress-free e (b) cellula con sollecitazione applicata al microscopio ottico; (c) cellula stress-free e (d) cellula con sollecitazione applicata in fluorescenza

Bibliografia

- [1] Frohlich, J and H Konig (2000). New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 567-572.
- [2] Gautier, M and E Piat (2002). An electromagnetic micromanipulation system for single-cell manipulation. *Journal of Micromechatronics*, 2, 87-119
- [3] Mizuno, A, M Nishioka, R Ishii and S Katsura (1995). Opto-electrostatic micromanipulation of single cell and DNA molecule. *Micro Machine and Human Science*, 153-159.
- [4] Serrell, DB, TL Oreskovic, AJ Slifka, RL Mahajan, DS Finch, (2007). A uniaxial bioMEMS device for quantitative force-displacement measurements. *Biomed Microdevices*, 9(2):267-75.

Capitolo 7.

Sviluppi futuri

There are things known and there are things unknown,
and in between are the doors

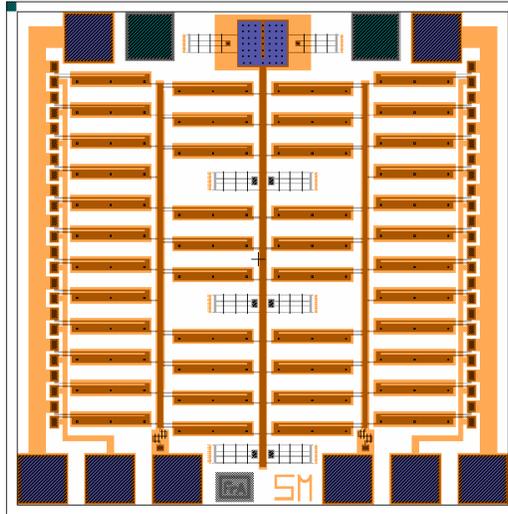
Jim Morrison

Il capitolo conclusivo descrive gli sviluppi futuri del presente lavoro di tesi. In particolare due saranno gli obiettivi principali da perseguire: ottimizzare da un lato la procedura di preparazione dei MEMS di seconda generazione collegati mediante fibra di carbonio; impiegare dall'altro una tecnica alternativa che possa consentire maggiori deformazioni della cellula, che con i dispositivi MEMS non sembrano potersi realizzare. Parallelamente saranno sviluppati nuovi motori che per la movimentazione non sfruttano fenomeni termici od elettrostatici bensì magnetici.

7.1 Nuovi motori termici

E' stato sviluppato un nuovo motore termico a 4 bancate di attuatori dotato di quei collegamenti elettrici che potessero garantire un'adeguata alimentazione del dispositivo (figura 7.1). Il MEMS è analogo strutturalmente al precedente dispositivo a 4 bancate (Antoniolli *et al.*, 2008), ma è dotato di quattro piste indipendenti per l'alimentazione dei bracci caldi di tutti gli attuatori. Inoltre, gli attuatori delle bancate più esterne hanno il pad del braccio freddo collegato ad una pista indipendente, non più a terra, in modo tale da poter essere attuati ad un qualsiasi potenziale e non essere necessariamente messi a terra. Infine, le molle centrali sono state irrigidite, portando la sezione di ciascuna trave

da 2 a 4 micron in modo da garantire circolazione di corrente, e connesse al round in modo da mettere a terra i bracci freddi dei motori termici delle due bancate centrali.



7.1 Nuovo MEMS a 4 bancate ottimizzato

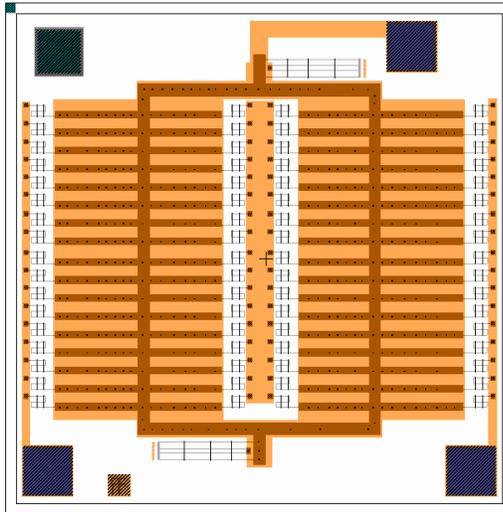
7.2 Motori magnetici

E' stata ideata una nuova tipologia di motori che utilizza per la movimentazione un fenomeno né termico né elettrico bensì magnetico. L'idea è di realizzare un motore di materiale magnetico, che, quando immerso in un campo magnetico generato ad esempio mediante un solenoide, risenta di una forza magnetica tale da allinearne i dipoli lungo la direzione del campo, generando una forza che movimenta l'intera struttura. Il processo PolyMUMPs purtroppo non offre possibilità di scelta sull'utilizzo dei materiali, che rimangono limitati ai tre descritti ai capitoli precedenti: polisilicio, ossido ed oro. L'unica strada perseguibile per l'utilizzo di un materiale magnetico è quella di un post-processing. Dal momento che nel corso del presente dottorato di ricerca è stata messa a punto una tecnica di microfabbricazione relativamente semplice e versatile che sfrutta un materiale polimerico fotopolimerizzabile, si è pensato di sfruttare lo stesso materiale impiegato per la funzionalizzazione dei substrati per realizzare un coating magnetico sui bracci del motore. L'idea è quindi quella di miscelare particelle magnetiche di dimensioni microscopiche e submicroscopiche (ferrofluidi ad esempio) nel monomero biocompatibile; distribuire il tutto, adeguatamente diluito in alcool etilico, sul MEMS e fotopolimerizzarlo localmente mediante laser. In questo modo è possibile ovviare alla

mancanza di offerta di materiali da parte del processo PolyMUMPs. L'altra possibilità, per la quale sono state inserite le piste in Poly0 osservabili in figura 7.2, è di rendere lo stesso materiale polimerizzabile per via chimica (sfruttando ad esempio reazioni di perossidi attivabili con la temperatura). In questo modo sarà sufficiente far circolare corrente, di intensità e per un tempo sufficiente da definirsi, nei bracci del motore, per polimerizzare il materiale solo in corrispondenza delle zone calde. Con il successivo rilascio, sarà infine possibile eliminare il materiale in eccesso.

Inserendo il dispositivo in un solenoide, o qualsiasi altro sistema in grado di creare un campo magnetico direzionale, è possibile polarizzare le particelle magnetiche, generando forze tali da movimentare l'intera struttura.

Il vantaggio principale offerto da un MEMS di questo tipo risiede nella possibilità di mantenere motore e piattaforma per la cellula sulla stessa outline di 2x2mm: il motore magnetico non ha problemi di operatività in ambiente liquido, non scalda quanto un motore termico e non va a modificare, per quanto noto allo stato attuale, il comportamento cellulare.



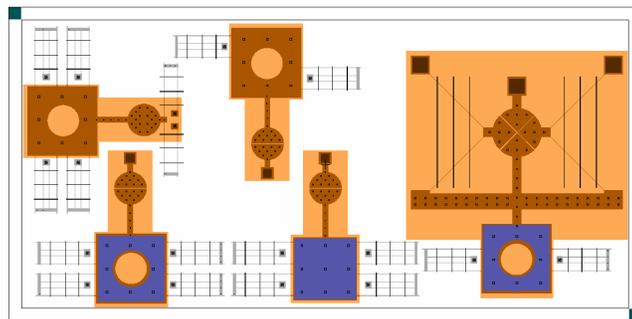
7.2 Nuovo MEMS a motore magnetico

7.3 Sistema di posizionamento per la generazione di forze controllate

E' stato recentemente effettuato l'acquisto di un sistema di posizionamento per la generazione di forze controllate: il sistema è costituito da un attuttore piezoelettrico, con corsa massima pari a 100 micron, *loop* chiuso, minimo spostamento effettuabile lungo

l'asse x pari a due nm, con potenziale di attuazione 0-100V corrispondente alla generazione di forze da 0 a 10N [3,4]. Il sistema è gestito da un *controller low voltage*, con sensibilità del μV . In questo modo, il controller stesso consente una prima grossolana determinazione della forza applicata al sistema, nell'ordine del centinaio di nN. Si prevedono comunque lo sviluppo e la realizzazione di un sensore di forza in grado di rilevare variazioni di forza nell'ordine del nN.

Per quanto riguarda la connessione alla piattaforma MEMS (di cui è illustrato il recente upgrade in figura 7.3), si ritiene che questa possa essere realizzata mediante le stesse micropunte di vetro descritte ai paragrafi precedenti, ridotte a dimensioni micrometriche utilizzando il puller ed arcuate mediante successiva applicazione di forza e calore. Le micropunte ad uncino saranno portate, utilizzando il micromanipolatore in prossimità del pad del MEMS, in cui è stato previsto un foro per l'ancoraggio (figura 7.3), che consentirà la realizzazione di spostamenti con risoluzione nanometrica e corsa nell'ordine delle decine di micron.



7.3 Nuovo MEMS a motore magnetico

Bibliografia

- [1] Antonioli F, S Maggiolino, P Gallina, N Scuor, R Mahajan and O Sbaizero (2008). A Novel MEMS Device for Single Cell Studies. *Proceedings of International Conference on MEMS And Nanotechnology*, in press.
- [2] Zahn M (2001). Magnetic fluid and nanoparticle applications to nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, **3** 73-78.
- [3] <http://www.physikinstrumente.com/en/products/prdetail.php?sortnr=202600>
- [4] <http://www.physikinstrumente.com/en/products/prdetail.php?sortnr=604100>

Conclusioni

Scopo del presente lavoro di tesi era lo sviluppo e la realizzazione di un dispositivo, o di una tecnica, per l'effettuazione di prove meccaniche sulla singola cellula, andando ad applicare su questa sollecitazioni note e rilevandone le conseguenti deformazioni.

Le tecniche al momento disponibili presentavano tutte alcuni limiti: la forza esercitata non era adeguata al fenomeno investigato; lo studio veniva effettuato su di un'intera popolazione di cellule, oppure, se sulla singola cellula, non poteva essere applicato a cellule aderenti ma solo in sospensione; la forza era esercitata localmente e non sull'intera cellula.

Al fine di bypassare i suddetti limiti, si è scelto di impiegare una tecnologia completamente differente, che però vedeva già diverse applicazioni nel settore biotecnologico: la scelta è ricaduta nei dispositivi Micro Elettro Meccanici, derivati dell'industria dei semiconduttori che, oltre ad avere componente elettica come i circuiti integrati, hanno anche possibilità di movimento realizzata mediante componenti meccanici di dimensioni microscopiche.

La prima parte del lavoro è stata rivolta alla messa a punto di dispositivi che, concepiti in maniera analoga a quelle che sono le tradizionali macchine universali per test meccanici, potessero consentire l'ancoraggio della singola cellula su di una piattaforma di geometrie differenti a seconda che si volesse applicare una sollecitazione di trazione uniassiale, biassiale, pluriassiale oppure di taglio. Tali dispositivi tuttavia hanno riscontrato diverse problematiche quando operanti in soluzioni saline quali i media cellulari. Sono stati quindi concepiti e sviluppati dei nuovi dispositivi che potessero bypassare le problematiche riscontrate con i primi: il MEMS è stato quindi sdoppiato su due outline di 2x2 mm, di cui una ospitante il motore per l'attuazione del dispositivo operante in aria, l'altro ospitante la piattaforma per la collocazione della cellula in esame operante in soluzione. Per completare il funzionamento di tali dispositivi è stata sviluppata e realizzata con successo una tecnica di collegamento di questi mediante una fibra di carbonio ancorata ai MEMS attraverso wire bonding.

Infine sono state acquisite e messe a punto la strumentazione e le tecniche che potessero consentire di operare con cellule viventi: è stato individuato un materiale tale da consentire un ancoraggio ottimale della cellula e con il quale si potesse funzionalizzare localmente la piattaforma per la cellula; è stato allestito un laboratorio per colture

Conclusioni

cellulari presso il Dipartimento dei Materiali e delle Risorse Naturali; è stata messa a punto una tecnica per la manipolazione di singole cellule; sono state infine eseguite alcune preliminari prove di trazione sulla singola cellula.

Gli sviluppi futuri del presente lavoro di tesi, tuttavia già in atto si rivolgono in tre direzioni: ottimizzazione dei risultati finora ottenuti, mediante la progettazione e realizzazione di motori termici ottimizzati che consentano spostamenti di almeno 5-6 micron; sviluppo di nuovi motori MEMS, movimentati mediante l'applicazione di campi magnetici esterni; acquisizione di un sistema di posizionamento per la generazione di forze controllate da collegare alle piattaforma MEMS per la generazione di spostamenti superiori ai 10 micron.

