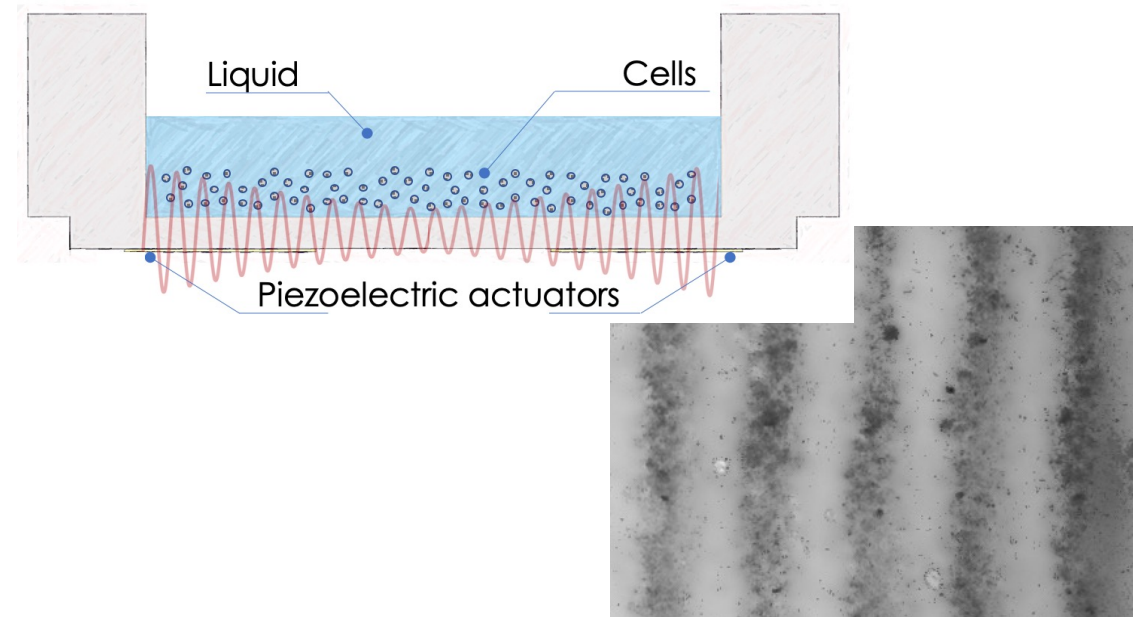


# Progetto **MIRACLE**

## Microsystems meRging ACoustics and fLuidics to build human engineered tissueE



Personale strutturato partecipante al progetto:

Marco FERRARI (DII)

Vittorio FERRARI (DII)

Marco BAU' (DII)

Pietro POESIO (DIMI)

Patrizia DELL'ERA (DMMT)

Antonella CONSIGLIO (DMMT)



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

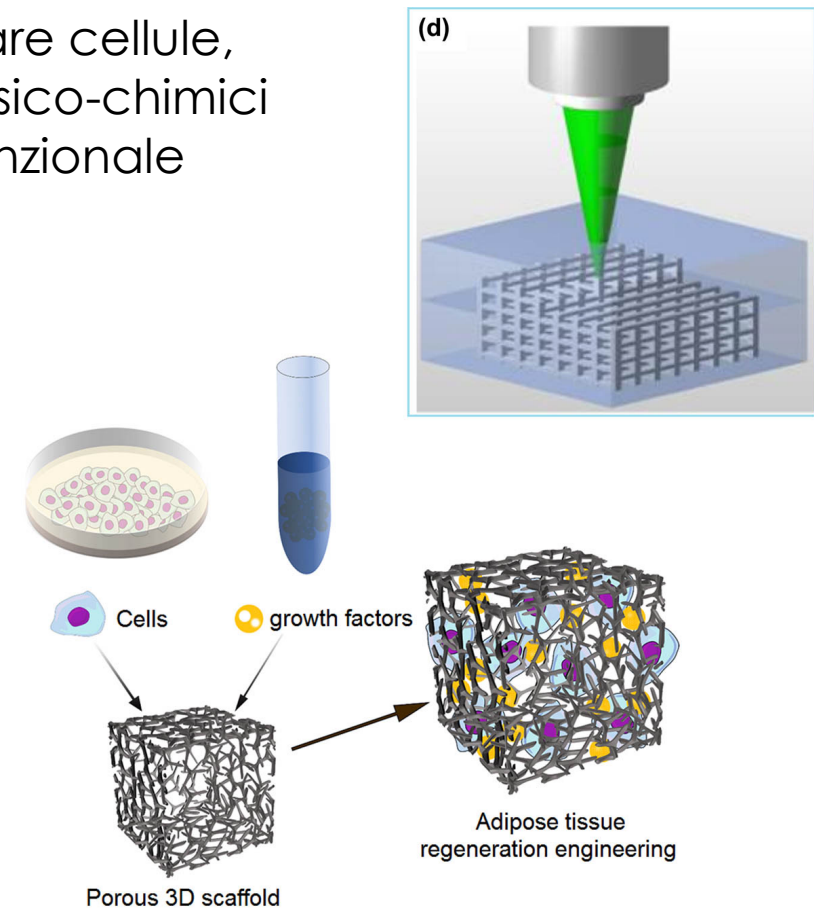
# Motivazione

**Ingegneria tissutale:** si riferisce alla pratica di combinare cellule, metodi di ingegneria, materiali e fattori biochimici e fisico-chimici adeguati che contribuiscono a costruire un tessuto funzionale biologico.

Metodi più comuni utilizzati per costruire tessuti:

- semina di cellule in scaffold 3D porosi prefabbricati
- sfruttare il comportamento di autoassemblaggio cellulare in strutture 3D.

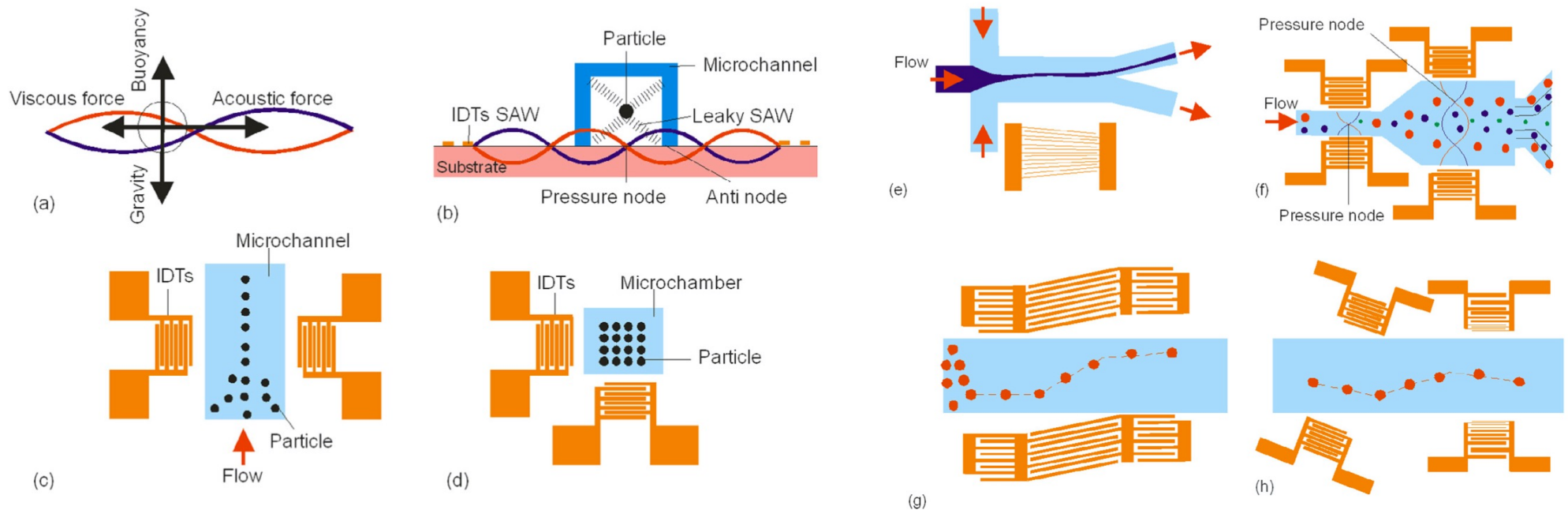
Tipicamente tali metodi non consentono di creare repliche tissutali identiche e strutture controllate.



Y.Q.Fu et.al, Advances in biomaterials for adipose tissue reconstruction in plastic surgery  
Nanotechnology Reviews 9 (2020) 385–395

# Motivazione

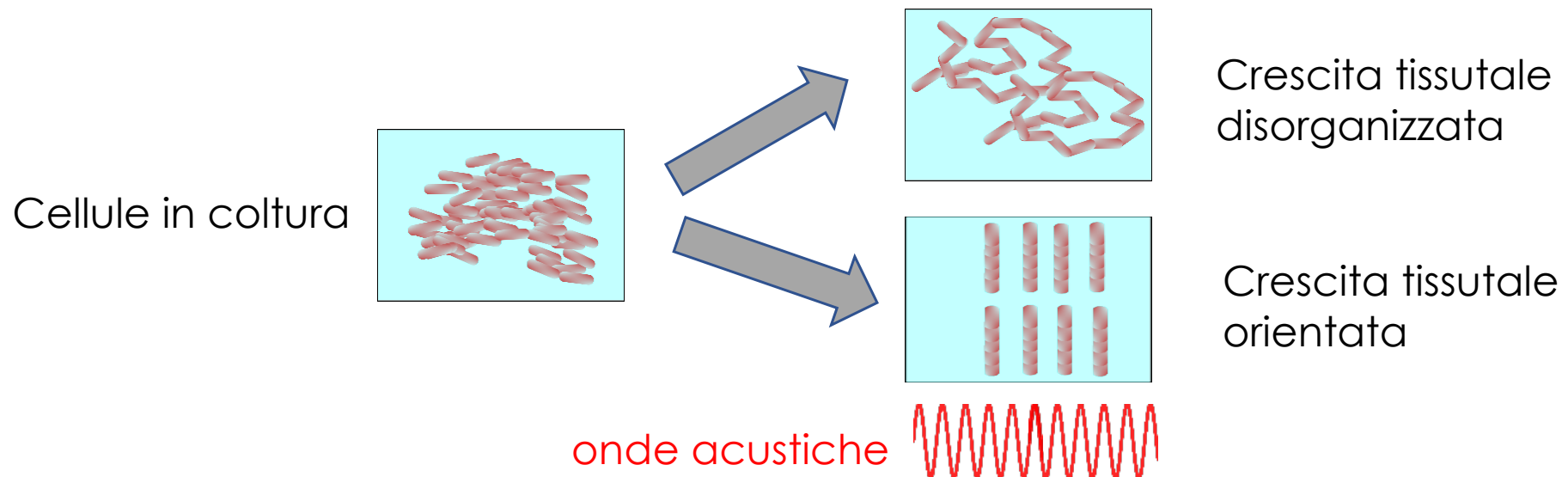
L'utilizzo e lo sfruttamento di opportune *onde acustiche* è ampiamente dimostrato in letteratura per la manipolazione e movimentazione di particelle in soluzioni liquide, anche in campo biologico e medico.



Y.Q.Fu et.al, Advances in piezoelectric thin films for acoustic biosensors, acoustofluidics and lab-on-chip applications  
Progress in Materials Science 89 (2017) 31–91

# Obiettivi del progetto MIRACLE

Sviluppo di: **tecniche**, **dispositivi** e **metodologie** per la creazione di campioni di tessuti umani *in-vitro* di alta qualità tramite processi ingegnerizzati e ripetibili.

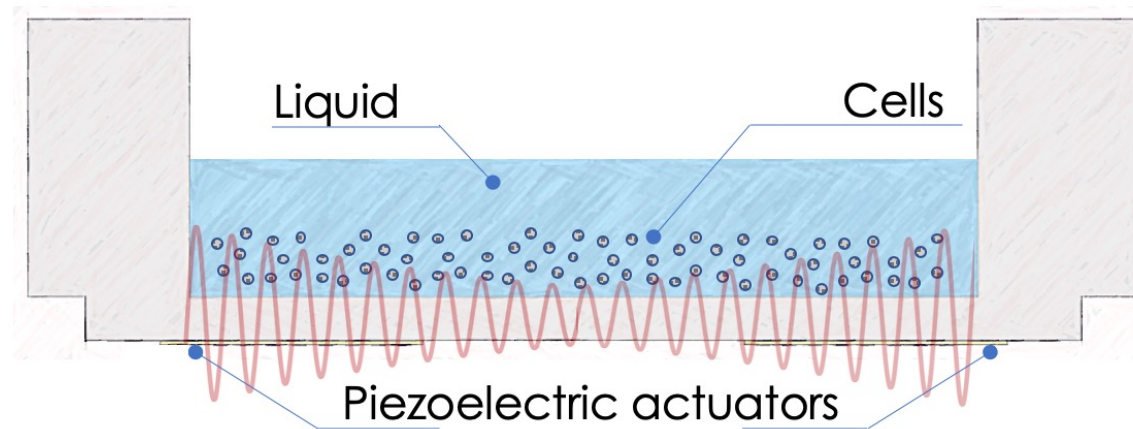
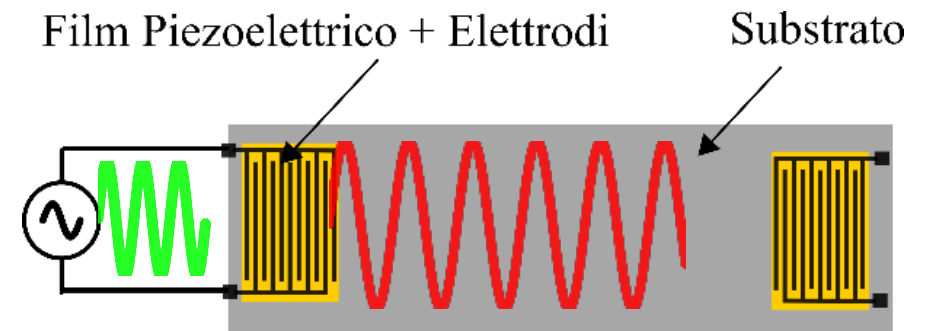


**L'utilizzo di onde acustiche permette la manipolazione e l'organizzazione delle cellule in coltura evitando l'utilizzo di tecniche invasive e/o strutture meccaniche particolari (scaffolds, ...)**

# Generazione di onde acustiche

Effetto piezoelettrico:

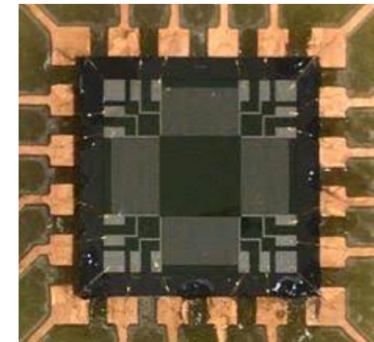
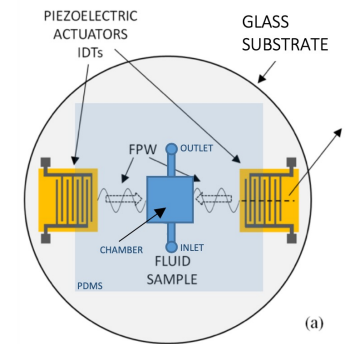
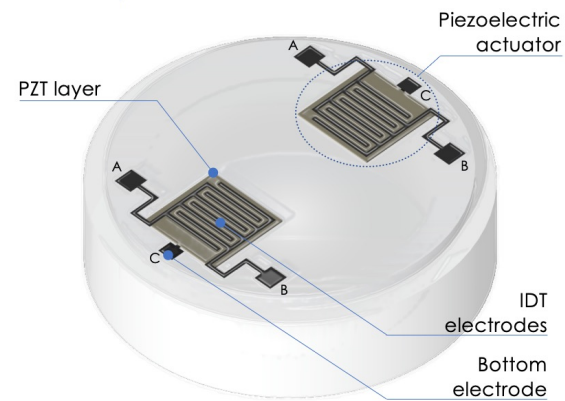
- Una sollecitazione meccanica induce uno sbilanciamento di carica elettrica (*effetto diretto*)
- Una tensione elettrica induce una deformazione meccanica (*effetto inverso*)
- Effetto inverso sfruttato per generare onde acustiche in opportuni substrati



La movimentazione e il posizionamento di particelle e cellule viene effettuato mediante onde acustiche, principalmente basandosi sui nodi e sugli antinodi di onde stazionarie.

# Progetto **MIRACLE**

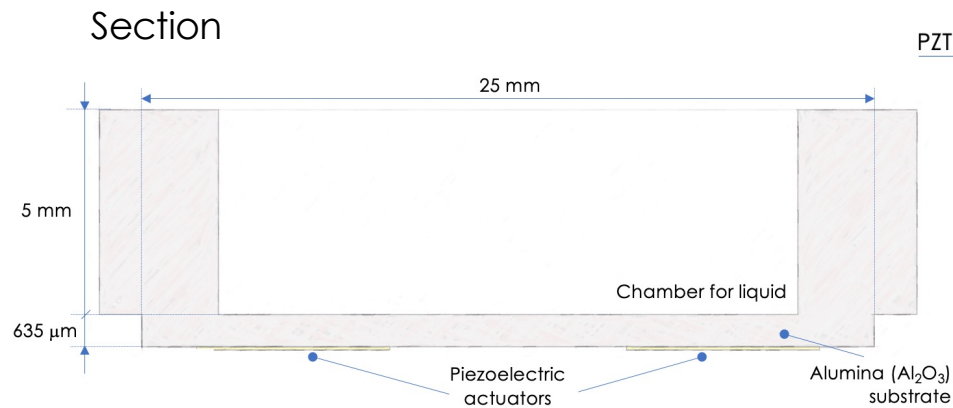
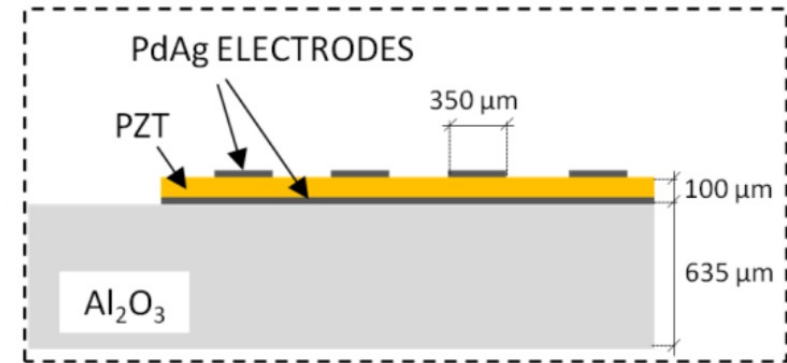
## Progettazione e realizzazione dispositivi



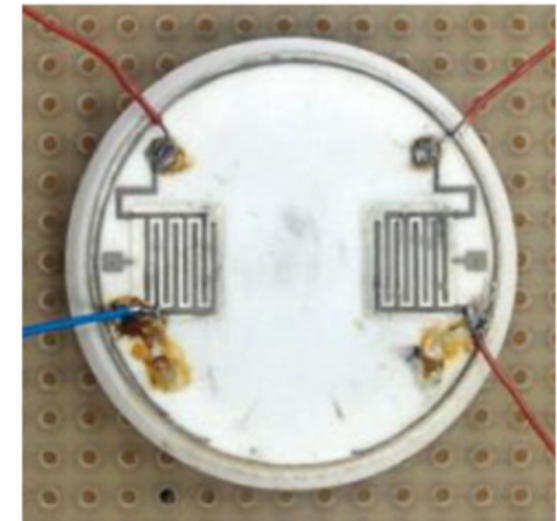
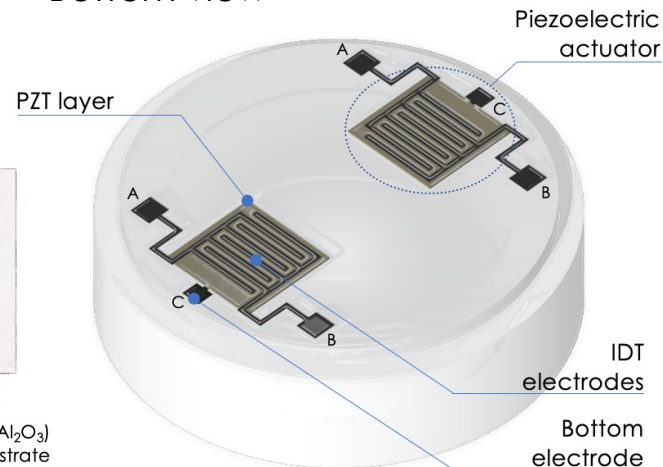
# Dispositivo 1 (substrato di allumina)

Generazione onde acustiche (FPW – flexural plate waves) tramite attuatori piezoelettrici

- Substrato in allumina
- Film piezoelettrico in PZT (zirconato titanato di piombo) realizzato per serigrafia
- Elettrodi interdigitati (IDT)
- Diametro: 25 mm
- Spessore: 5 mm
- Frequenze operative 6 ÷ 7 MHz

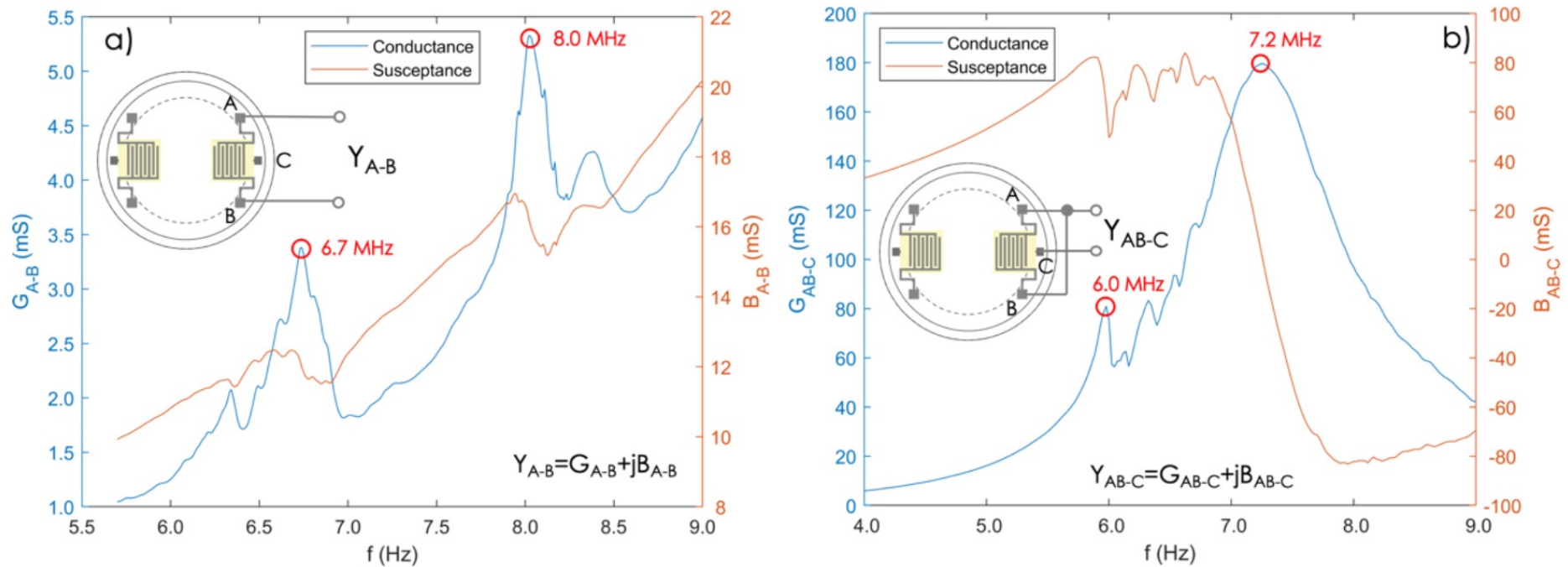


Bottom view



# Dispositivo 1 (substrato di allumina)

Caratterizzazione elettrica: misura dello spettro dell'ammettenza tra gli IDT.



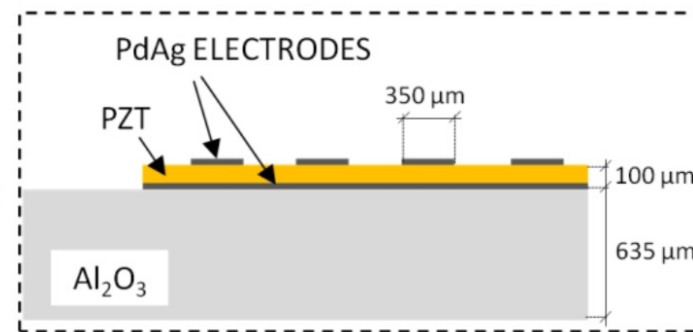
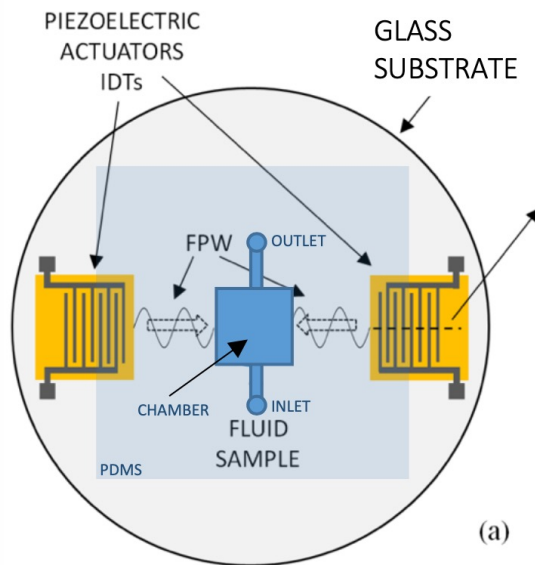
Frequenze di risonanza: 6.7 MHz, 8.0 MHz ( $Y_{A-B}$ ) e 6.0 MHz, 7.2 MHz ( $Y_{AB-C}$ ).



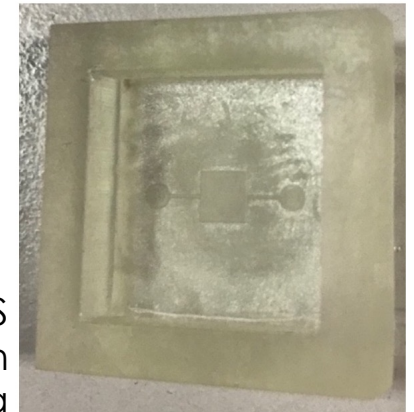
## Dispositivo 2 (substrato di vetro)

Generazione onde acustiche (FPW – flexural plate waves) tramite attuatori piezoelettrici

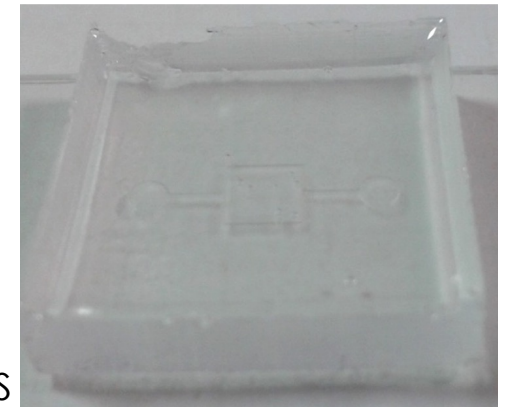
- Substrato in vetro, camera in PDMS
- Film piezoelettrico in PZT (zirconato titanato di piombo) realizzato per serigrafia
- Elettrodi interdigitati (IDT)
- Diametro: 50 mm
- Frequenze operative  $6 \div 7$  MHz



Stampo per camera in PDMS  
realizzato in  
prototipazione rapida



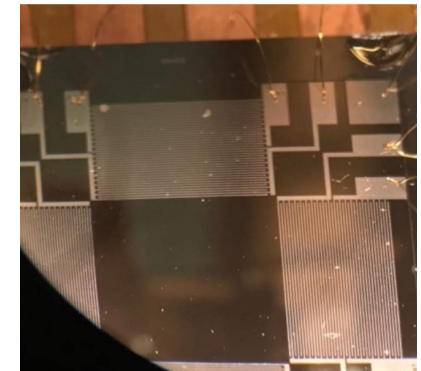
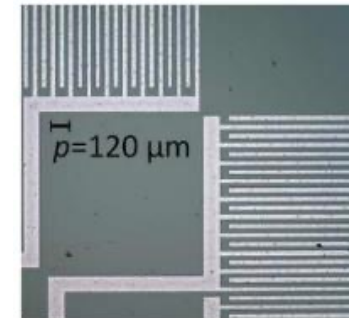
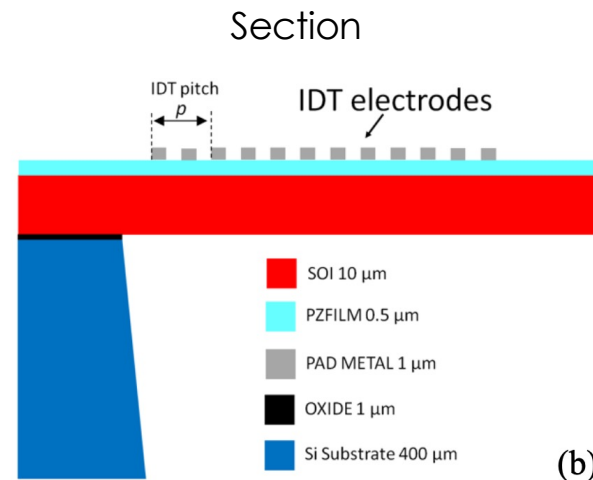
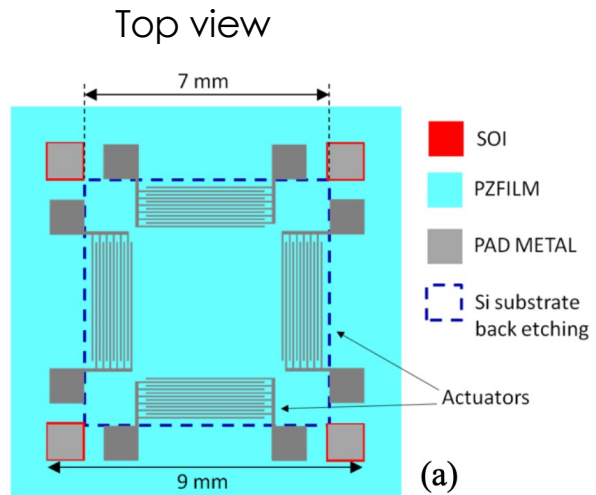
Camera in PDMS



# Dispositivo 3 (MEMS - substrato di silicio)

Generazione onde acustiche (FPW – flexural plate waves) tramite attuatori piezoelettrici  
MEMS: micro electro-mechanical system

- Substrato silicon-on-insulator (SOI)
- Film piezoelettrico in nitrato di alluminio (AlN)
- Coppie di elettrodi interdigitati (IDT), passo 120  $\mu\text{m}$
- Dimensione di 9 mm  $\times$  9 mm
- Frequenze operativa 13 MHz



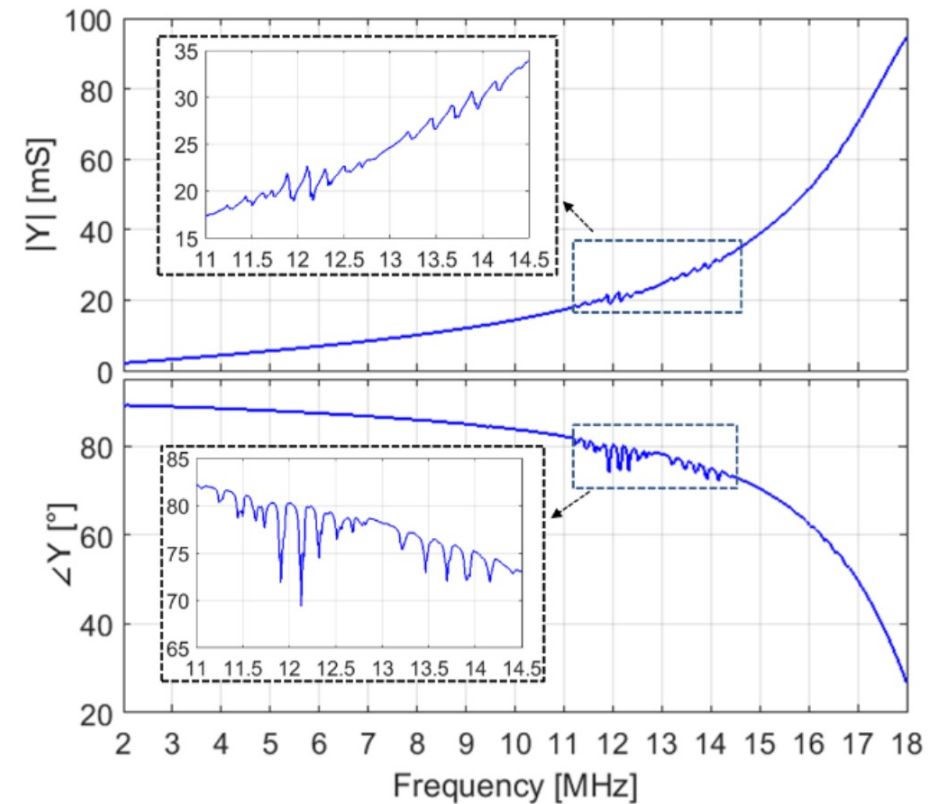
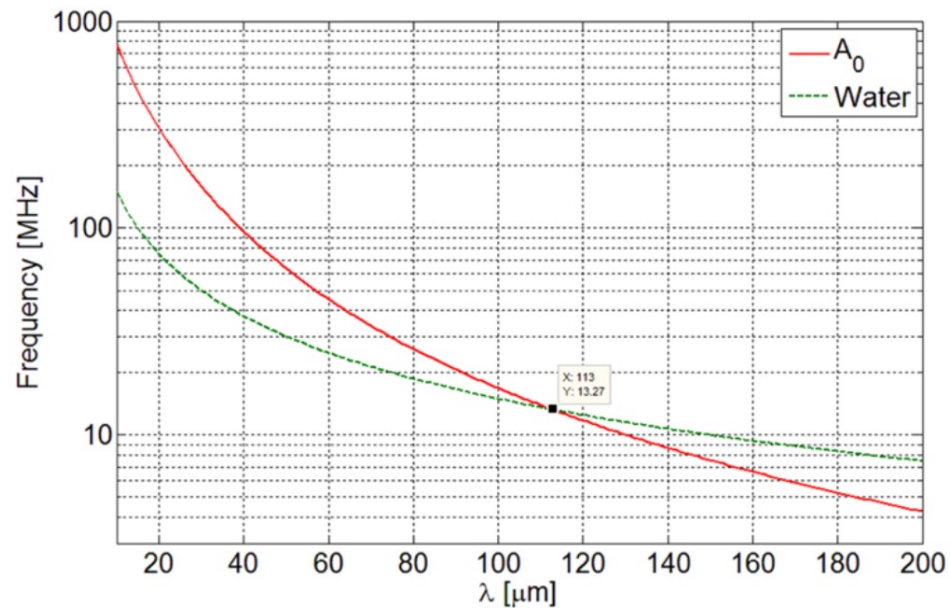
Upside down section view



In collaborazione con CNRS, Grenoble INP, TIMA, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble

# Dispositivo 3 (MEMS - substrato di silicio)

Caratterizzazione elettrica: misura dello spettro dell'ammettenza tra gli IDT.

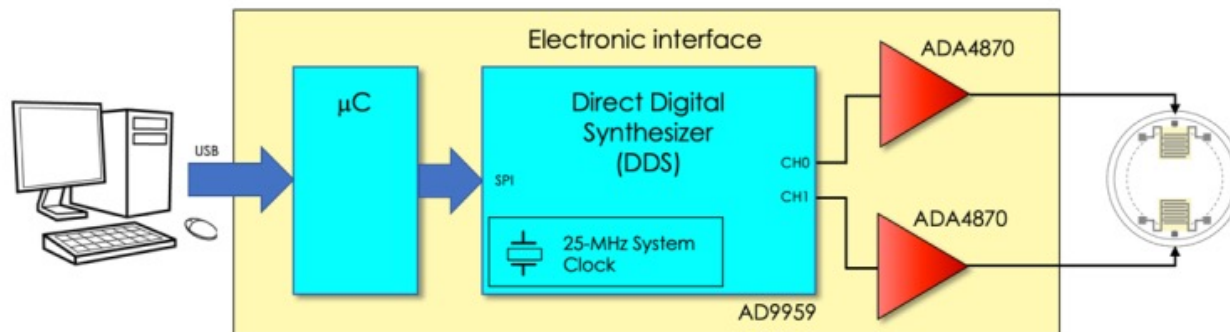


Frequenze di risonanza: tra 11.5 MHz e 14 MHz, come atteso.

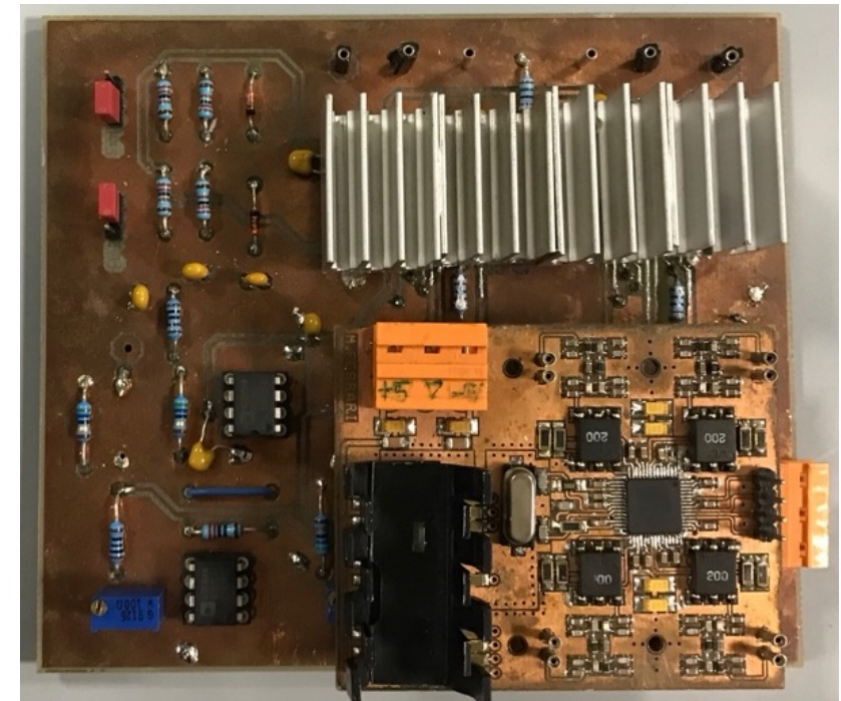
# • Elettronica di pilotaggio degli attuatori

- Frequenza, ampiezza e fase dei segnali generati programmabili tramite PC
- Utilizzo di DDS (direct digital synthesizer)
- Amplificatori (ADA4870): tensione massima 40 V picco-picco
- Frequenza di funzionamento: fino a 15 MHz

Schema a blocchi del sistema di pilotaggio degli attuatori piezoelettrici

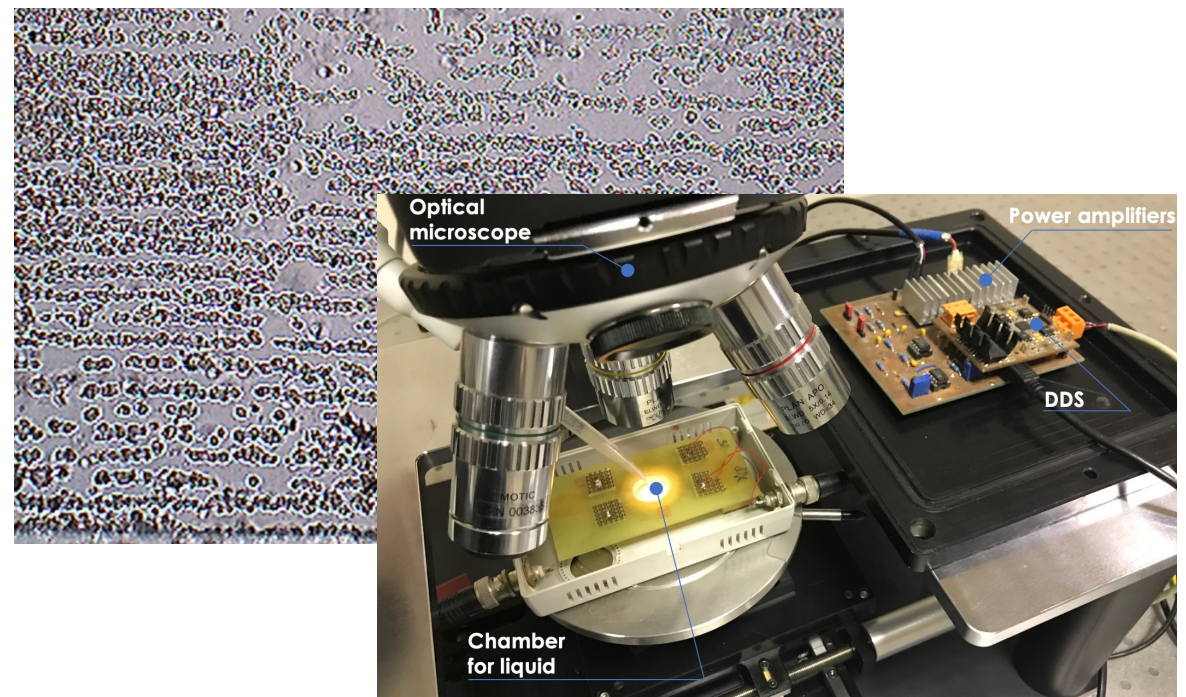


Prototipo realizzato



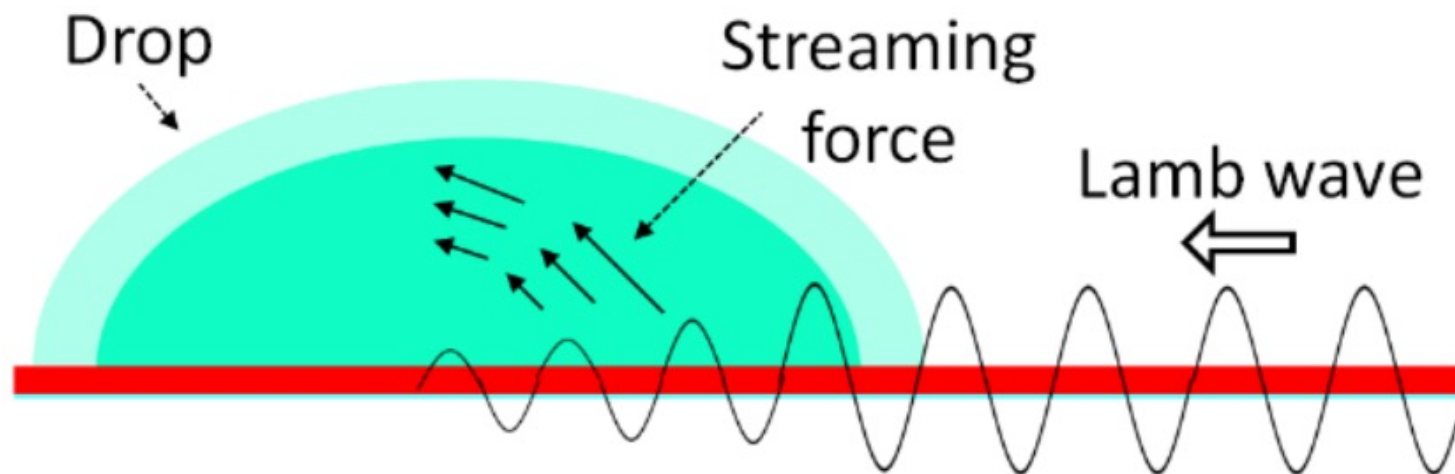
# Progetto **MIRACLE**

## Risultati sperimentali conseguiti



## • Miscelazione/centrifugazione di soluzioni

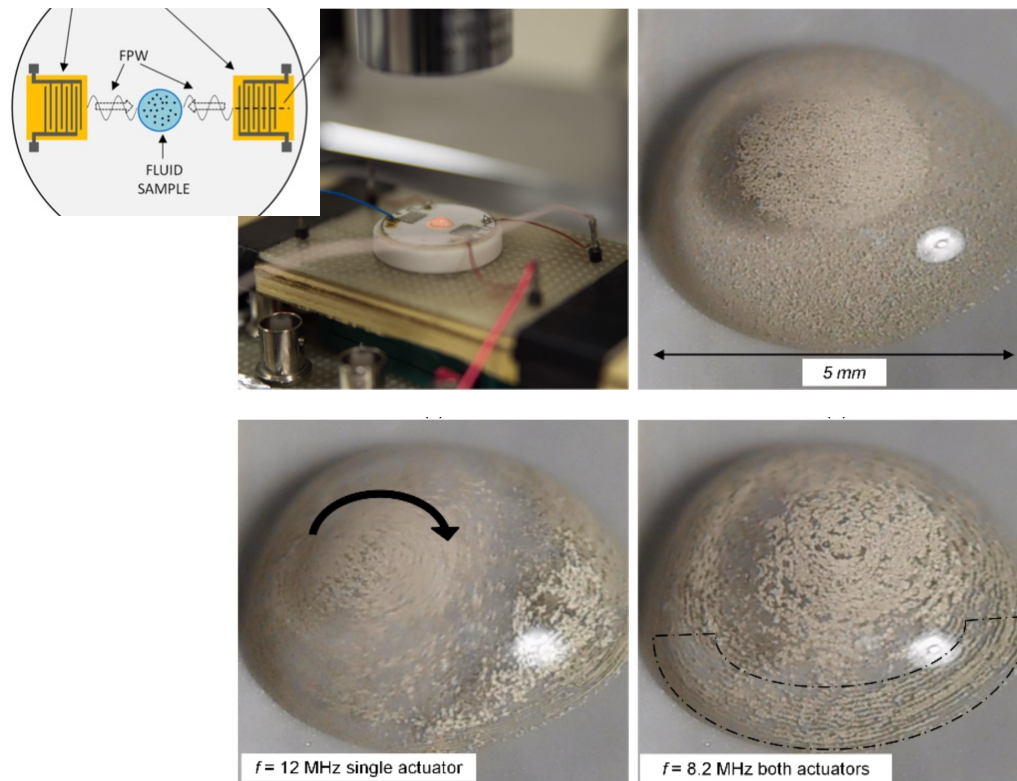
La generazione delle onde acustiche è stata utilizzata per miscelare/centrifugare particelle all'interno di liquido



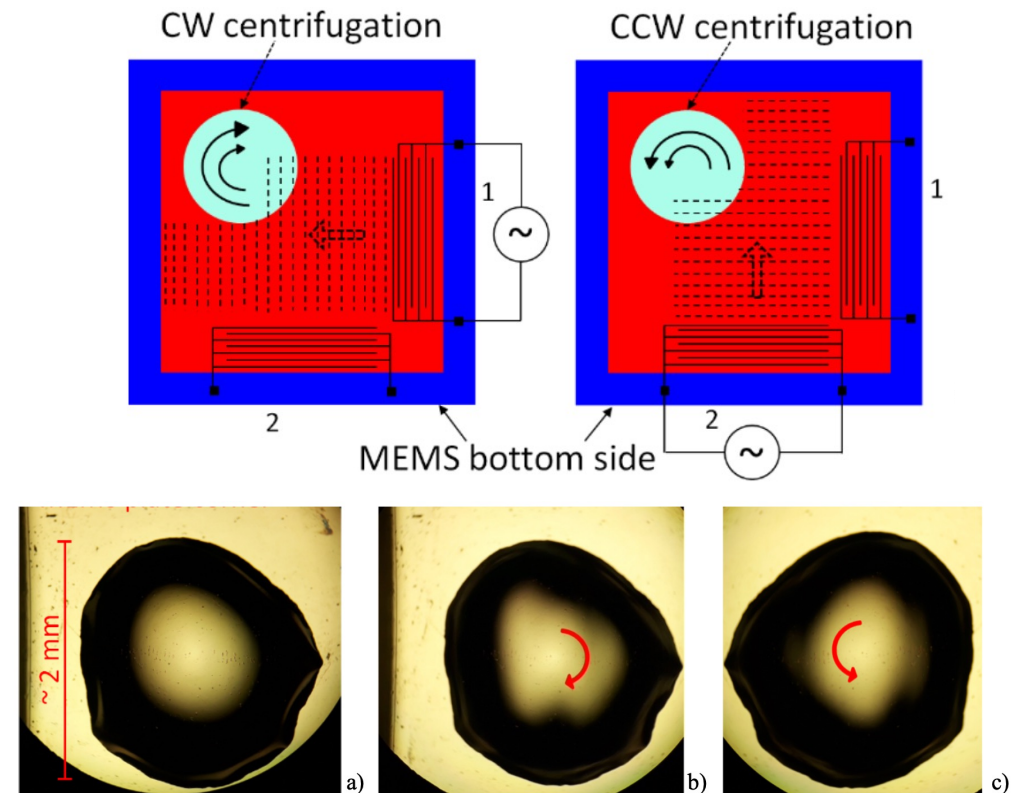
# Miscelazione/centrifugazione di soluzioni

Test effettuati con microsfere di vetro (diametro medio 25 $\mu$ m) disperse in liquido (acqua)

Dispositivo 1 (allumina)

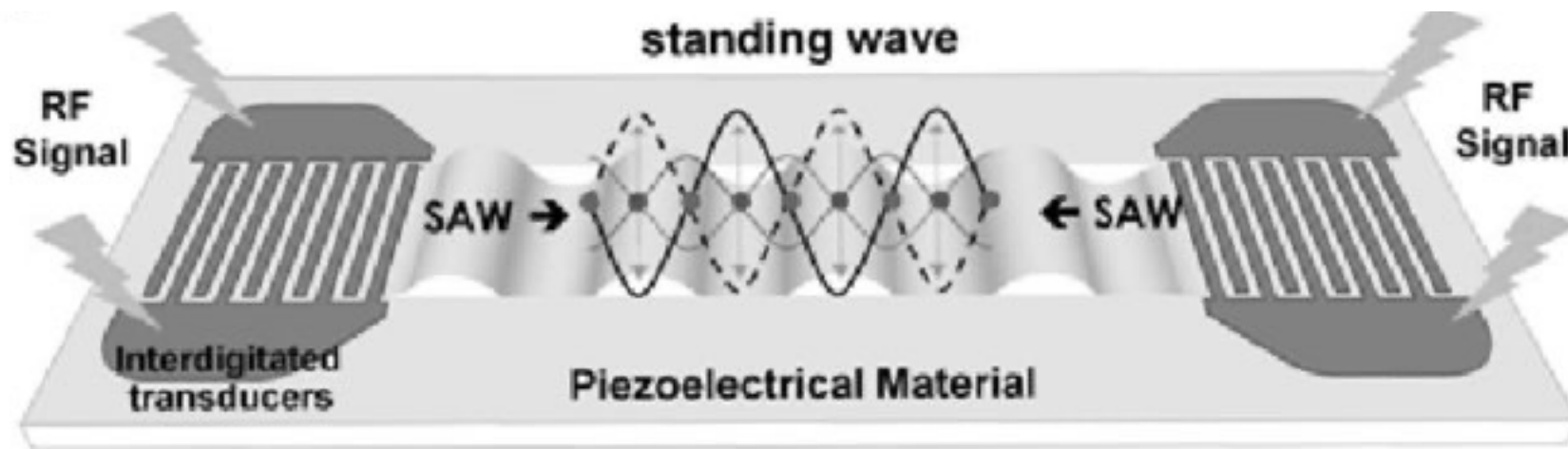


Dispositivo 3 (MEMS – silicio)



## • Allineamento di particelle

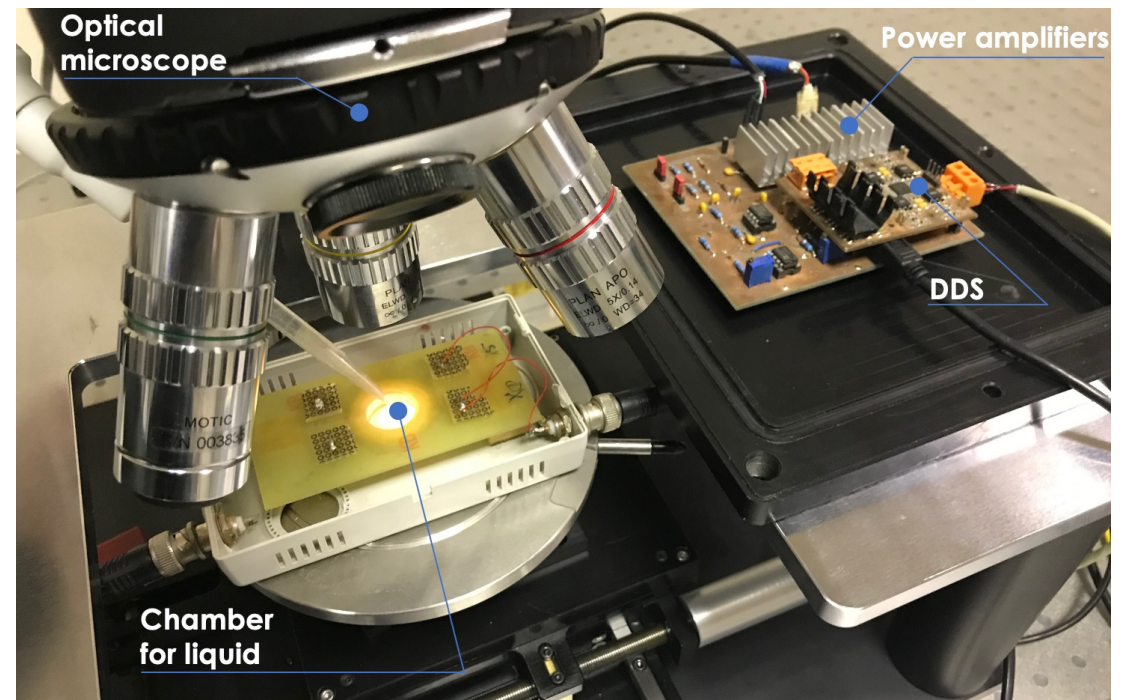
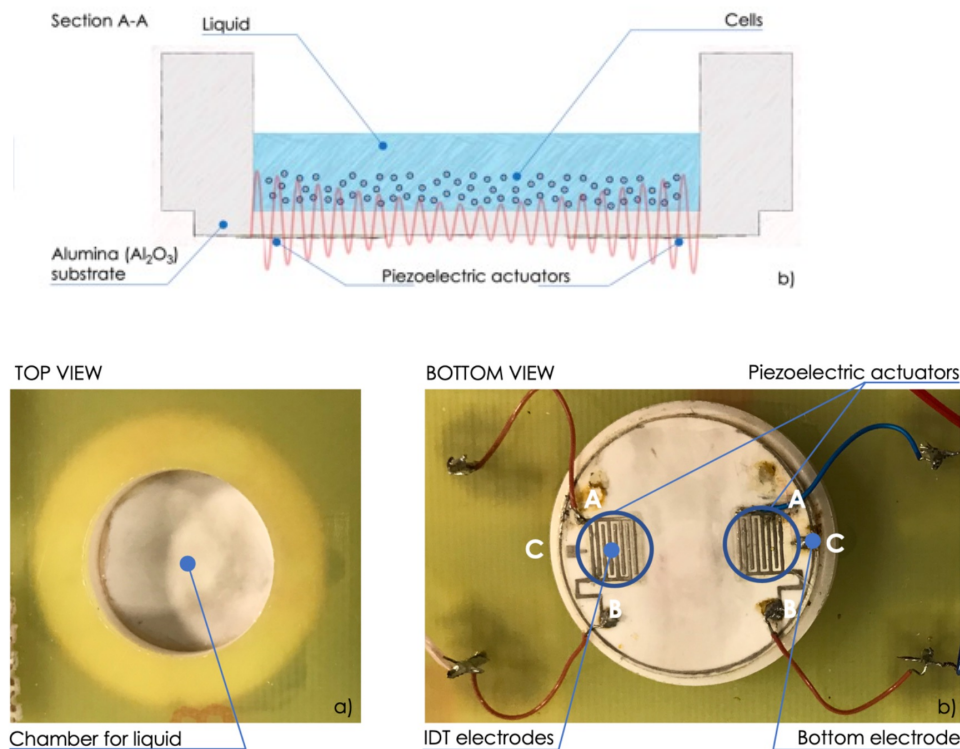
Sfruttamento degli attuatori piezoelettrici per generare onde acustiche stazionarie e nodi di pressione nel fluido, dove è previsto che le cellule siano confinate





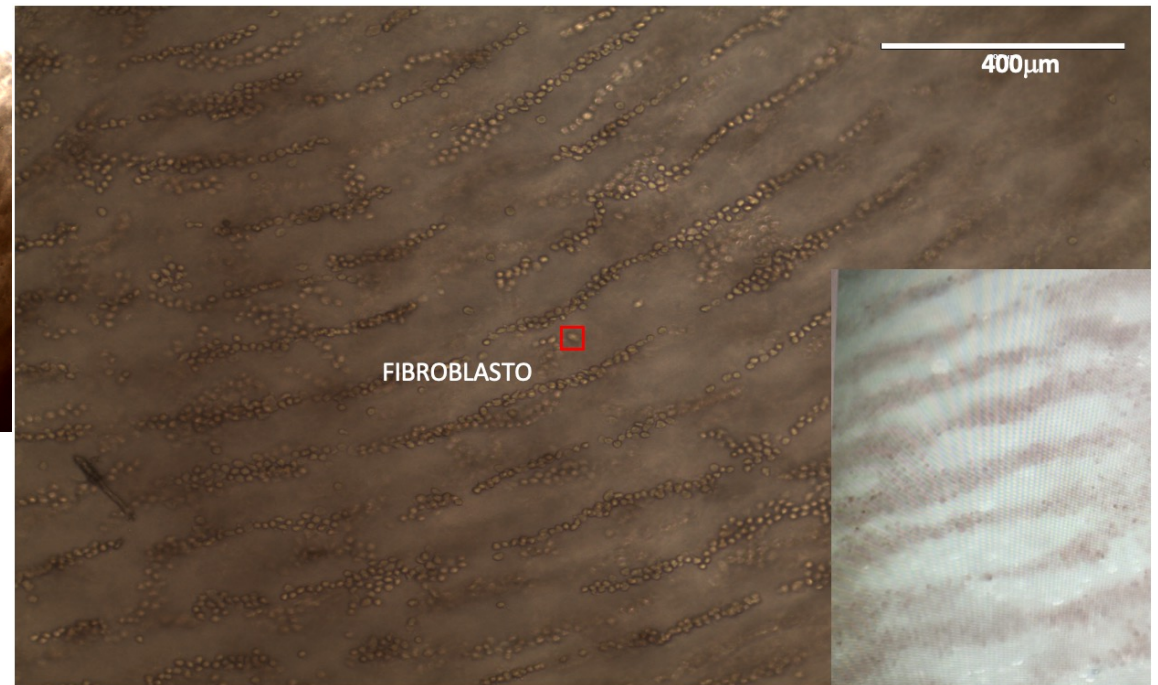
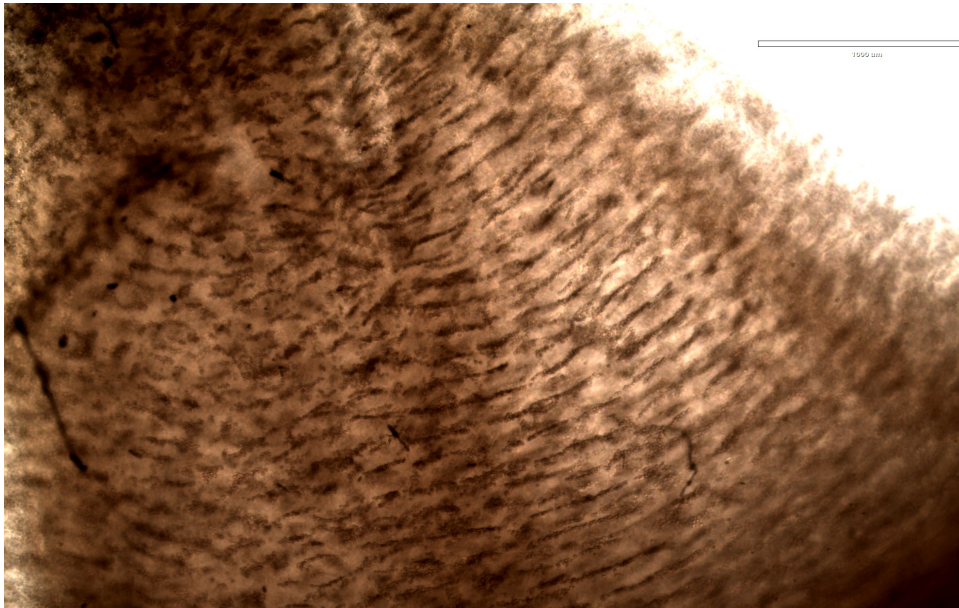
# • Allineamento di particelle – Dispositivo 1

## Setup sperimentale



# • Allineamento di particelle – Dispositivo 1

Fibroblasti di prepuzio umano (HFF – Human Foreskin Fibroblasts, diametro medio 20  $\mu\text{m}$ )  
Tampone fosfato salino (PBS -phosphate buffer saline)



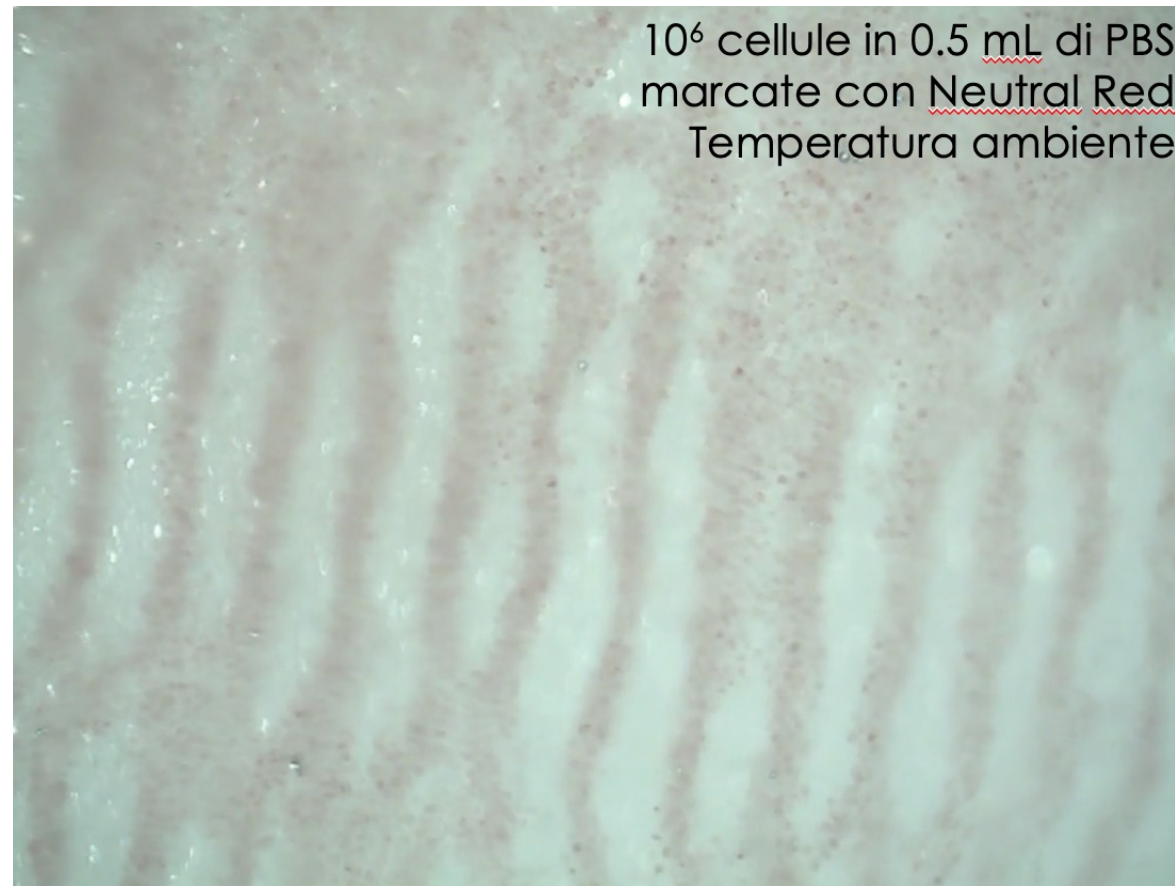
$10^6$  cellule in 0.5 mL di PBS  
Temperatura ambiente

Progetto **MIRACLE**

Microsystems meRging ACoustics and fLuidics to build human engineered tissue

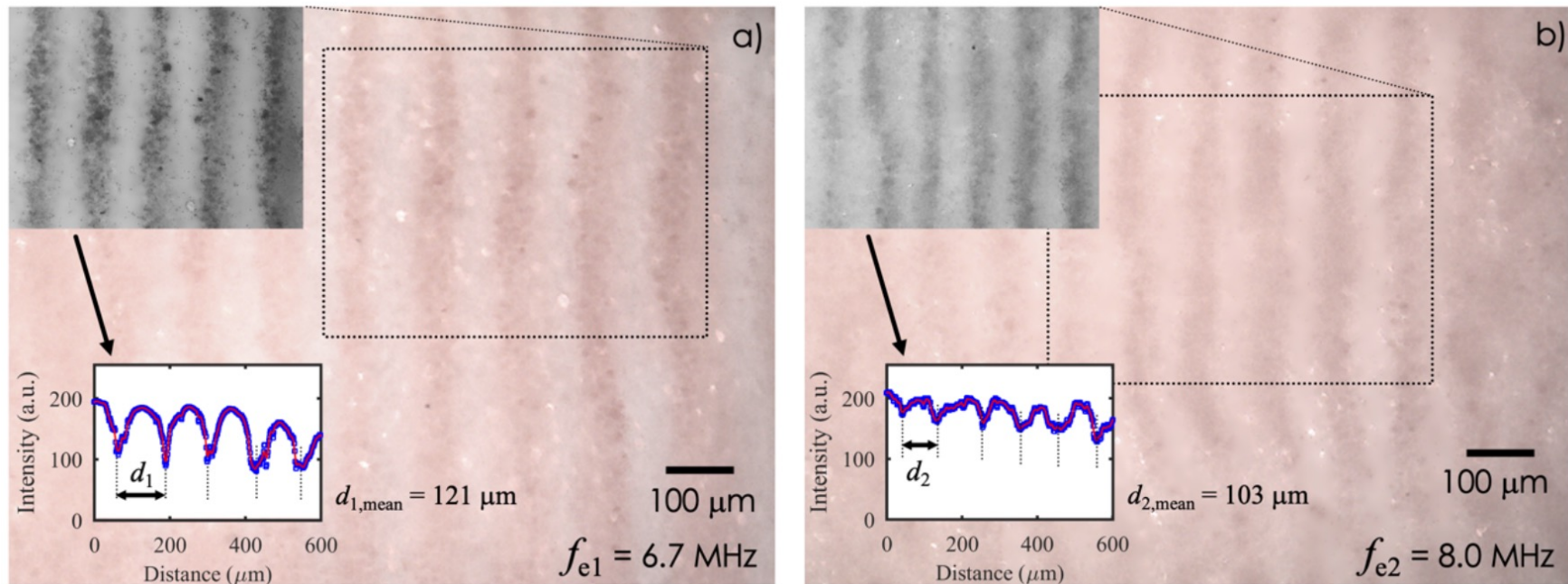
# • Allineamento di particelle – Dispositivo 1

Fibroblasti di prepuzio umano (HFF – Human Foreskin Fibroblasts, diametro medio 20  $\mu\text{m}$ )  
Tampone fosfato salino (PBS -phosphate buffer saline)



# • Allineamento di particelle – Dispositivo 1

Fibroblasti di prepuzio umano (HFF – Human Foreskin Fibroblasts, diametro medio 20  $\mu\text{m}$ )  
Tampone fosfato salino (PBS -phosphate buffer saline)



La distanza  $d$  tra i differenti nodi di pressione nel fluido, dove le cellule sono state confinate, corrisponde a **metà lunghezza d'onda**.

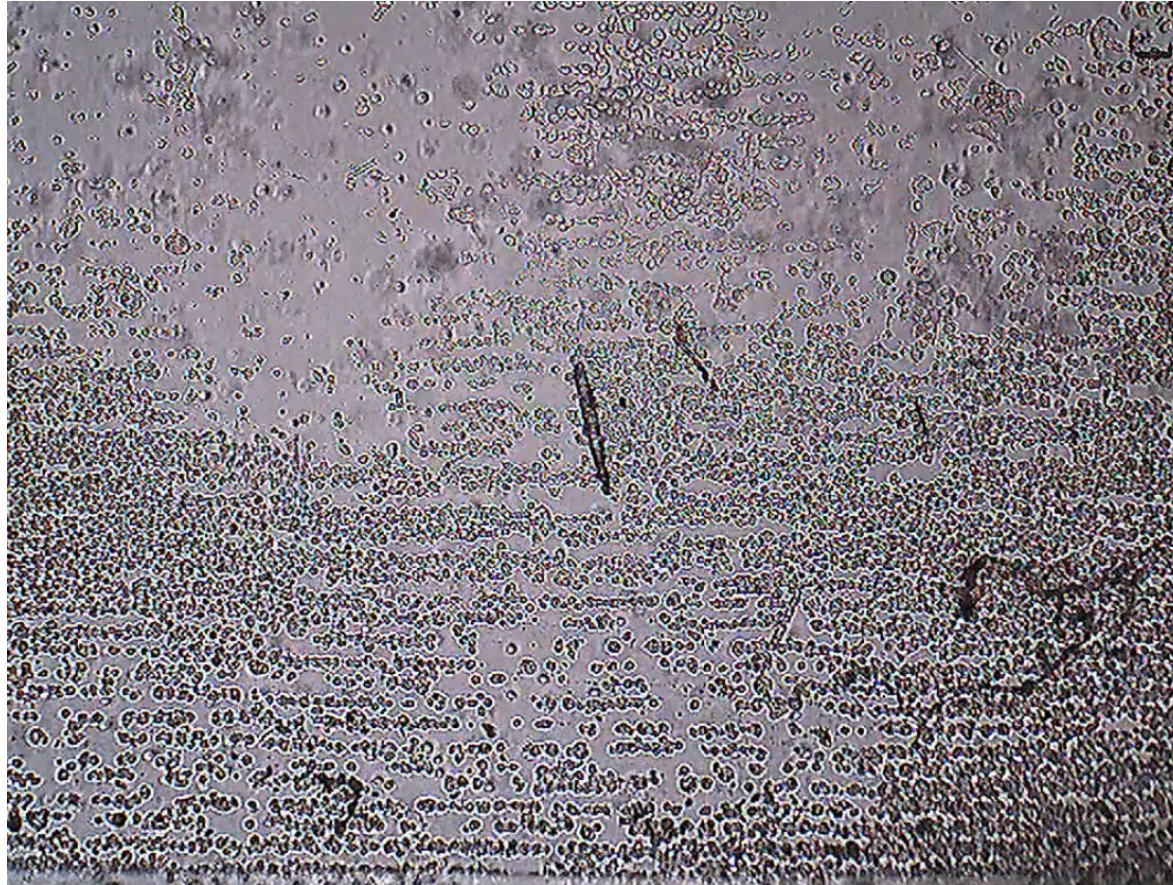
$$d = \lambda/2 = v/(2f_e)$$

$v$  : velocità di propagazione delle onde acustiche nel PBS (1500 m/s)

$f_e$  : frequenza di eccitazione

## • Allineamento di particelle – Dispositivo 3

Microsfere di vetro (diametro medio 25  $\mu\text{m}$ ) disperse in acqua demineralizzata



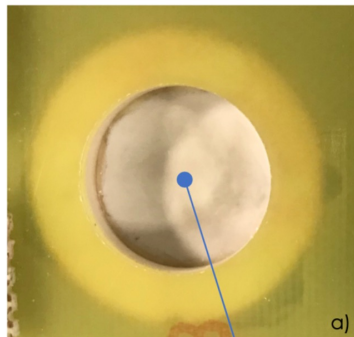
# • Allineamento di cellule verso la creazione di tessuti

Sperimentazione:

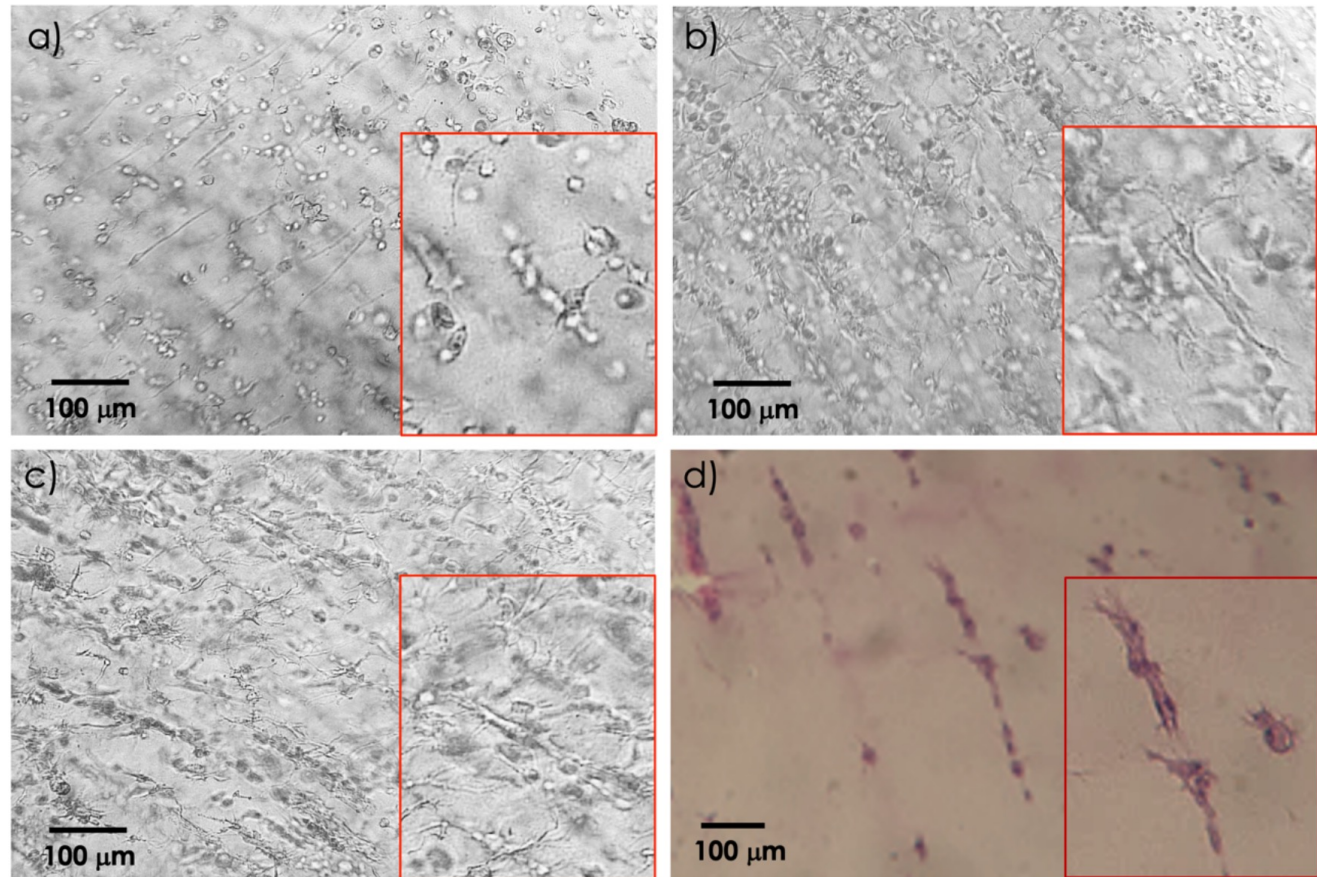
- dispositivo 1 (substrato allumina)
- sterilizzazione del dispositivo
- riempimento a temperatura ambiente
- eccitazione applicata per 5 minuti
- utilizzo di fibrinogeno + trombina
- coagulo trasferito in piastra di coltura

La vitalità delle cellule è stata preservata

TOP VIEW



Chamber for liquid



Immagini di fibroblasti umani (HFF) allineati nella fibrina e tenuti in coltura per 24 (a), 48 (b), e 72 (c) ore. Sezione istologica delle stesse cellule colorate con ematossilina ed eosina dopo 72 ore (d).

Progetto **MIRACLE**

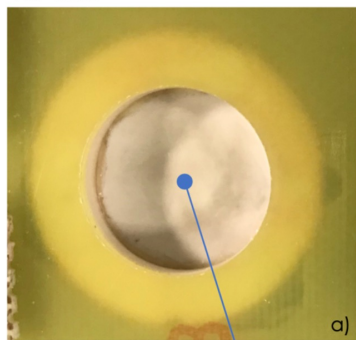
Microsystems merging Acoustics and Fluidics to build human engineered tissue

# • Allineamento di cellule verso la creazione di tessuti

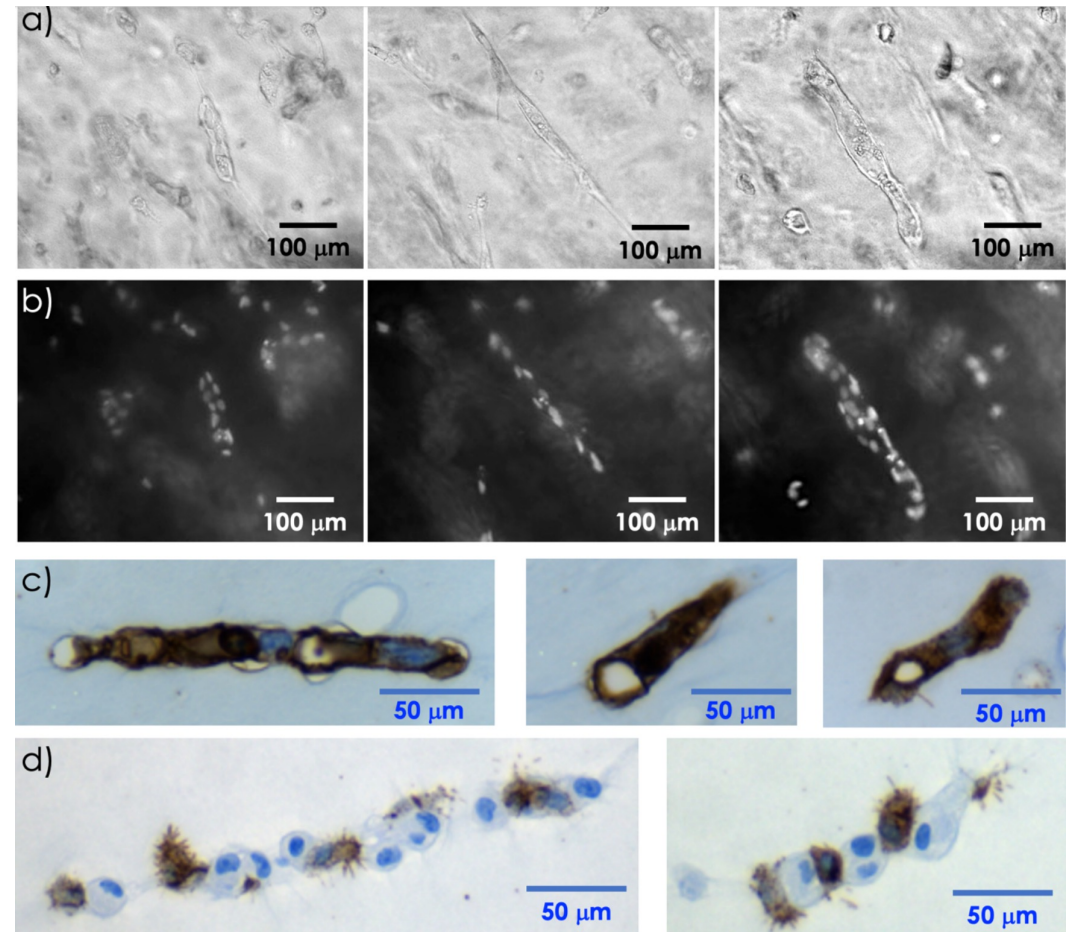
Intrappolamento di cellule staminali mesenchimali (ahMSC) e cellule endoteliali (HUVEC) nel coagulo di fibrina.

Le cellule endoteliali si riconoscono dalla espressione di CD31 (in marrone).

TOP VIEW



Chamber for liquid



Cellule endoteliali allineate nel coagulo di fibrina a 96 h (a). Colorazione DAPI che mostra i nuclei cellulari (b). Colorazione CD31 (clone PECAM-1) di HUVEC (c). Colorazione con CD31 di HUVEC e ahMSC intrappolate nel coagulo (d).

## Conclusioni

Individuate **tecniche** per la creazione di campioni di tessuti umani *in-vitro* di alta qualità tramite processi ingegnerizzati e ripetibili

- sfruttamento di onde acustiche stazionarie

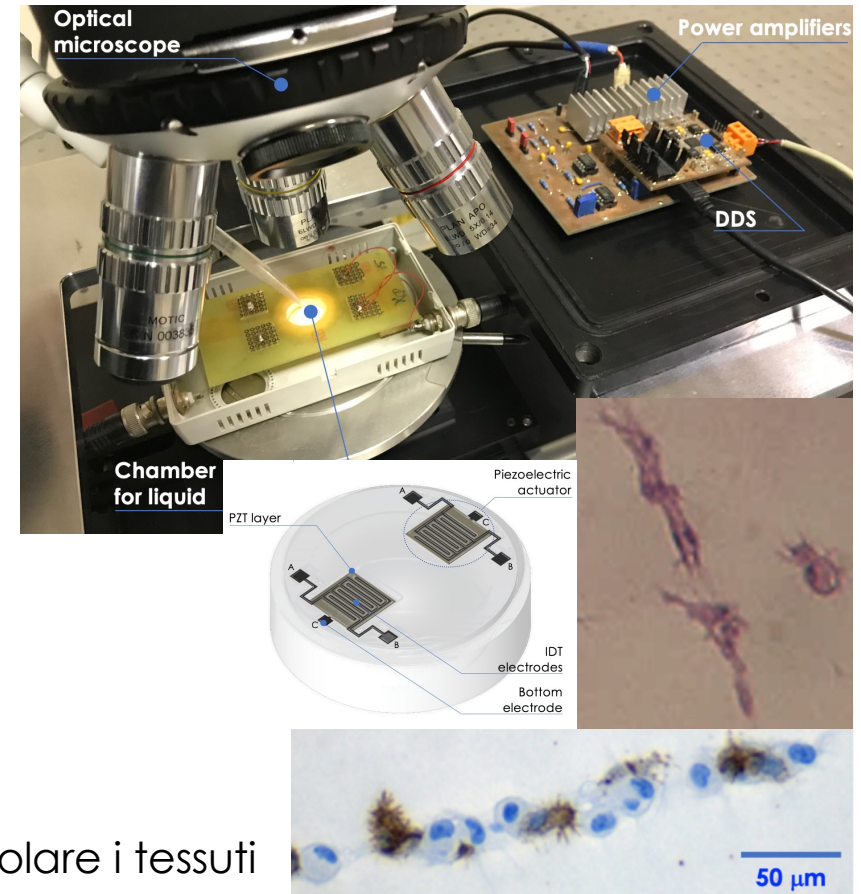
Realizzati differenti **dispositivi** per la centrifugazione e l'allineamento delle cellule in coltura

- attuatori piezoelettrici
- substrati: allumina, silicio, vetro

Definite **metodologie** per ottenere tessuti ingegnerizzati preservando la vitalità delle cellule

- attivazione delle onde acustiche
- utilizzo di fibrinogeno + trombina
- trasferimento in piastra di coltura

Sviluppi futuri: - ottimizzazione dei dispositivi  
- sfruttamento delle onde acustiche per stimolare i tessuti





# Progetto **MIRACLE**

## Divulgazione, riconoscimenti, pubblicazioni

### Innovation Design Contest, sponsored by ON Semiconductor

Ad aggiudicarsi il primo premio, ovvero uno stage di due settimane presso il centro di Ricerca & Sviluppo di **ON Semiconductor** a Monaco di Baviera è **Nicola Pienazza** con la tesi di laurea dal titolo "**PiezoTissuE: microsistemi acustici piezoelettrici per l'ingegnerizzazione di tessuti umani**".



A screenshot of the Applied Sciences journal website. The page features a navigation menu with options like 'Submit to Applied Sciences', 'Review for Applied Sciences', and 'Share'. Below the menu is a 'Journal Menu' with various links such as 'Applied Sciences Home', 'Aims &amp; Scope', 'Editorial Board', and 'Instructions for Authors'. On the right side, there is a featured article titled 'Arrangement of Live Human Cells through Acoustic Waves for Tissue Engineering Applications' with a blue header and a globe image. Below the article, there is a section for 'Applied Sciences — Open Access Journal' with a description of the journal and its metrics, including an Impact Factor of 2.474 (2019) and a 5-Year Impact Factor of 2.458 (2019).



# Attività di divulgazione e riconoscimenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

Meet Me Tonight" (28/09/2018)

"Sulla cresta dell'onda: onde acustiche stimolano e controllano la crescita di tessuti biologici"

## Sulla cresta dell'onda

### Progetto **MIRACLE**

Onde acustiche stimolano e controllano  
la crescita di tessuti biologici

Personale strutturato partecipante al progetto:

Marco FERRARI (DII)  
Vittorio FERRARI (DII)  
Pietro POESIO (DIMI)  
Patrizia DELL'ERA (DMMT)  
Antonella CONSIGLIO (DMMT)



BRESCIA  
Museo Santa Giulia  
28 Settembre 2018



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

## La Notte dei Ricercatori si è rivelata una eccellente vetrina per capire cosa si fa nelle Università

### Chi ricerca cosa

Laura Fasani

BRESCIA. Si è visto di tutto - diciamo molto, non esageriamo - alla Notte Europea dei Ricercatori venerdì scorso al Museo di Santa Giulia. Un faccia a faccia con la ricerca, fra stand, laboratori e storytelling, organizzato dalle accademie bresciane per la prima volta riunite in un unico spazio. Un modo eccellente di mettersi in vetrina, di far sapere a chi sta fuori cosa si fa, che cosa si ricerca, in che ambiti si ricerca e lavorano le nostre Università. Ai visitatori è stato offerto un percorso tematico fra tecnologia, arte, fisica applicata, ambiente e salute, per avere un assaggio delle eccellenze nostrane, in modo interattivo e divertente. Tutte con un denominatore comune: l'innovazione, nelle sue forme più sofisticate, alla 4.0, e nelle applicazioni di tutti i giorni.

**La fisica al servizio dell'arte.** Il mondo della ricerca è oggi un incontro proficuo tra saperi diversi. Lo dimostrano le tecniche spettroscopiche, di norma impiegate per studiare materiali particolari nel laboratorio di fisica della prof.ssa Stefania Pagliara in Cattolica, ma che ormai sono utilizzate anche per analizzare i dipinti. Il

principio è simile a quello di un'impronta digitale: lo spettroscopio rileva il colore e lo associa, in base alle lunghezze d'onda, al pigmento con lo stesso spettro di riflettanza.

Grazie a un catalogo digitale di tutti i pigmenti dal 1400 al secolo scorso, fisici e storici dell'arte possono datare un quadro, riconoscere un falso e gli eventuali rifacimenti. Senza fare prelievi diretti. «Il mio motto è: cerca di fare stato e non toccare l'opera»: lo dice Gianluca Poldi, fisico milanese che da vent'anni si occupa di diagnostica sulle opere d'arte nei musei e nelle collezioni più prestigiose. «Oggi possiamo fare analisi con tecniche non invasive, strumenti portatili e metodi multispettrali (infrarossi, UV, raggi X, ecc.) con un unico screening», racconta Poldi. «La ricerca oggi si fa nelle università, non più nei musei, ma è una risorsa quando gli atenei hanno a disposizione, come nel caso di Brescia, strumenti all'avanguardia per sperimentare».

**Elettrica-mente.** Efficacia e non invasività sono le parole d'ordine anche se si parla di Alzheimer. A raccontarlo è Valentina Cantoni, psicologa 28enne nella Clinica Neurologica dell'Ospedale Civile e

membro di Airalzh, che qualche settimana fa ha presentato a Milano i primi risultati della ricerca. Nello specifico, la dottoressa e i suoi colleghi si occupano di stimolazione magnetica transcranica e hanno individuato alcuni parametri che indicano l'insorgenza della malattia.

Il team si serve - a grandi linee - di un campo magnetico per stimolare le aree cerebrali del paziente e vedere così quali neurotrasmettitori sono alterati. «Siamo in fase di studio - spiega Valentina Cantoni - ma questa diagnosi, oltre a essere meno costosa e invasiva di altre, ci permette di individuare anche decadimenti cognitivi lievi».

**Cavalca l'onda.** Nelle sale del museo, gli intrecci fra scienze diverse sono numerosi. Come quello di Miracle, nome azzeccato per il progetto che mira, nientemeno, a creare tessuti biologici con le onde acustiche, in particolare quelle cardiache. Le menti all'opera appartengono ai biologi del laboratorio c-FRU, diretto dalla prof.ssa Patrizia Dell'Era, e agli ingegneri del Gruppo di ricerca di Sensori, Microsistemi ed Elettronica. A questi ultimi si deve l'invenzione di un dispositivo su cui le onde acustiche "spingono" le cellule, che si dispongono in base alle forme del dispositivo stesso. A seconda di come vengono fatte allineare, infatti, le cellule danno poi vita a un determinato tessuto biologico. «Così abbiamo superato i tradizionali reticolati di polimeri - spiegano - usando lo stesso principio ma con una tecnologia più agile». //



Dalle Università

Progetto **MIRACLE**

Microsystems merging Acoustics and Fluidics to build human engineered tissue

# Attività di divulgazione e riconoscimenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

Outstanding Poster Award  
49° Meeting Annuale SIE2017 (Palermo, 21-23 Giugno 2017)

Piezoelectric Actuators for Microfluidic Acoustic-Wave Manipulation of In-Liquid Particles  
Autori: M.Demori, M.Bau, S.Dalola, M.Ferrari, V.Ferrari



Progetto **MIRACLE**

*Microsystems meRging ACoustics and fLuidics to build human engineered tissue*



# Attività di divulgazione e riconoscimenti

Arrangement of Live Human Cells through Acoustic Waves Generated by Piezoelectric Actuators for Tissue Engineering Applications

Autori: M.Serzanti, M.Bau, M.Demori, S.Calamaio, M.Cominelli, P.L.Poliani, P.Dell'Era, M.Ferrari, V.Ferrari

pubblicato su Applied Sciences (ISSN 2076-3417)  
è stato selezionato e messo in evidenza  
nella pagina principale del sito web della rivista  
(<https://www.mdpi.com/journal/applsci>):

The screenshot shows the journal's website interface. On the left is a navigation menu, and on the right is a featured article banner with a blue and orange background. The banner includes the article title, the journal name 'Applied Sciences', and a list of key features like 'Open Access', 'High Visibility', 'CiteScore', and 'Rapid Publication'. Below the banner, the journal's impact factors are listed.

**Journal Menu**

- Applied Sciences Home
- Aims & Scope
- Editorial Board
- Reviewer Board
- Topic Board
- Instructions for Authors
- Special Issues
- Sections & Collections
- Article Processing Charge
- Most Cited & Viewed
- Journal Statistics
- Journal History
- Journal Awards
- Society Collaborations
- Conferences
- Editorial Office

**Journal Browser**

**Applied Sciences — Open Access Journal**

Applied Sciences (ISSN 2076-3417; CODEN: ASPCC7) is an international peer-reviewed open access journal on all aspects of applied natural sciences published semi-monthly online by MDPI.

- **Open Access** free for readers, with article processing charges (APC) paid by authors or their institutions.
- **High Visibility:** Indexed by the Science Citation Index Expanded (Web of Science) [search for "Applied Sciences-Basel"], Scopus, Inspec (IET) and other databases.
- **CiteScore** (2019 Scopus data): 2.4, which equals rank 85/299 (Q2) in 'General Engineering' and 233/460 in 'General Materials Science'.
- **Rapid Publication:** manuscripts are peer-reviewed and a first decision provided to authors approximately 28.5 days after submission; acceptance to publication is undertaken in 3.6 days (median values for papers published in this journal in the first half of 2020).
- **Recognition of Reviewers:** reviewers who provide timely, thorough peer-review reports receive vouchers entitling them to a discount on the APC of their next publication in any MDPI journal, in appreciation of the work done.

**Impact Factor:** 2.474 (2019) ; 5-Year Impact Factor: 2.458 (2019)

Progetto **MIRACLE**

Microsystems meRging ACoustics and fLuidics to build human engineered tissueE

# Attività di divulgazione e riconoscimenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

Il progetto:

PiezoTissuE: Microsistemi acustici piezoelettrici per l'ingegnerizzazione di tessuti umani

è risultato vincitore dell' "INNOVATION DESIGN CONTEST 2020" organizzato dalla rivista Selezione di Elettronica e sponsorizzato da ON Semiconductor.

<https://www.elettronicanews.it/innovation-design-contest-2020-ecco-i-finalisti/>



## Innovation Design Contest, sponsored by ON Semiconductor

Ad aggiudicarsi il primo premio, ovvero uno stage di due settimane presso il centro di Ricerca & Sviluppo di **ON Semiconductor** a Monaco di Baviera è **Nicola Pienazza** con la tesi di laurea dal titolo "**PiezoTissuE: microsistemi acustici piezoelettrici per l'ingegnerizzazione di tessuti umani**".

Progetto **MIRACLE**

*Microsystems meRging ACoustics and fLuidics to build human engineered tissUE*

1. Demori Marco, Baù Marco, Ferrari Marco, Ferrari Vittorio (2017). Particle Manipulation by Means of Piezoelectric Actuators for Microfluidic Applications. Lecture Notes in Electrical Engineering, Vol. 457, Sensors and Microsystems, Proceedings of the 19th National Conference (AISEM 2017), Lecce (Italy), February 21-23, 2017, pp.223-228. DOI: 10.1007/978-3-319-66802-4\_29
2. Demori Marco, Baù Marco, Dalola Simone, Ferrari Marco, Ferrari Vittorio (2017). Piezoelectric Actuators for In-Liquid Particle Manipulation in Microfluidic Applications. Proceedings 2017, Vol.1(4), 392. DOI: 10.3390/proceedings1040392.
3. Demori Marco, Baù Marco, Dalola Simone, Ferrari Marco, Ferrari Vittorio (2017). Piezoelectric actuators for microfluidic acoustic-wave manipulation of in-liquid particles. Proceedings of the SIE2017 Conference, Palermo (Italy), June 21-23, 2017, pp. 29-30.
4. Ginestra Paola Serena, Pandini Stefano, Fiorentino Antonio, Benzoni Patrizia, Dell'Era Patrizia, Ceretti Elisabetta (2017). Microstructured scaffold for guided cellular orientation: Poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospinning on laser ablated titanium collector. CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology, Vol.19, pp. 147-157. DOI: 10.1016/j.cirpj.2017.08.002

5. Mora Cristina, Serzanti Marialaura, Giacomelli Alessio, Beltramone Silvia, Marchina Eleonora, Bertini Valeria, Piovani Giovanna, Refsgaard Lena, Olesen Morten Salling, Cortellini Venusia, Dell'Era Patrizia (2017). Generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) from an atrial fibrillation patient carrying a PITX2 p.M200V mutation. *Stem Cell Research*, Vol.24, pp. 8-11. DOI: 10.1016/j.scr.2017.08.007
6. Demori Marco, Baù Marco, Ferrari Marco, Basrouf Skandar, Rufer Libor, Ferrari Vittorio (2019). MEMS Device with Piezoelectric Actuators for Driving Mechanical Vortexes in Aqueous Solution Drop. *Proceedings of Transducers 2019 - Eurosensors XXXIII Conference*. Berlin (Germany), June 23-27, 2019, pp. 2318-2321. DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2019.8808791.
7. Serzanti Marialaura, Baù Marco, Demori Marco, Calamaio Serena, Cominelli Manuela, Poliani Pietro Luigi, Dell'Era Patrizia, Ferrari Marco, Vittorio Ferrari (2020). Arrangement of live human cells through acoustic waves generated by piezoelectric actuators for tissue engineering applications. *APPLIED SCIENCES*, vol. 10, ISSN: 2076-3417. DOI: 10.3390/app10103477