



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI ECONOMIA, INGEGNERIA, SOCIETÀ E IMPRESA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: ENGINEERING FOR ENERGY AND
ENVIRONMENT XXXIV CICLO

**SVILUPPO DI UNA INNOVATIVA STRUMENTAZIONE
INTEGRATA PER MISURE DI IMPEDENZA AD ALTA
SENSIBILITÀ SU NANOSAMPLE**
Spettroscopia di Bio-Impedenza

(SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE **CHIM/01**)

Tesi di dottorato di:
Dott. Ing. Valeriano BONUGLIA

FIRMA

Coordinatore del corso
PROF. ANDREA LUIGI FACCI

FIRMA

Tutore
PROF. STEFANO UBERTINI

FIRMA

Co-tutore
PROF.SSA CLAUDIA PELOSI

FIRMA

A.A. 2018/21

*SVILUPPO DI UNA INNOVATIVA STRUMENTAZIONE INTEGRATA PER MISURE DI
IMPEDENZA AD ALTA SENSIBILITÀ SU NANOSAMPLE
Spettroscopia di Bio-Impedenza – Valeriano Bonuglia*

Tesi di Dottorato

Viterbo, 13 luglio 2022

ISBN _____ - _____ - _____

*To my Mother always present in my life..., in memory of the
great teaching she left to all those who loved her and to those
who hated her until the day she died.
She was an example of coherence, moral integrity that united
to a strong personality made her unique in this world.*

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	8
ELENCO DELLE FIGURE	9
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	14
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	16
CAPITOLO 1 SPETTROSCOPIA DI BIO-IMPEDENZA: APPLICAZIONI IN BIOLOGIA E MEDICINA	20
1.1 Rilevamento e diagnostica di patologie Genetiche ed Epigenetiche.....	20
1.1.1 I Biosensori nel rilevamento e la diagnostica delle patologie genetiche ed epigenetiche	21
1.1.2 Obiettivi e approcci.....	22
1.2 Bio-ingegneria e bio-sensori	23
1.2.1 Peculiarità dei tumori infiltranti e numeri del cancro nel mondo	24
1.2.2 Il ruolo dei Biosensori nella rilevazione del Cancro.....	27
1.3 Inferenza sul cancro dovuta a mutazioni ereditarie e somatiche.....	27
1.3.1 Cambiamenti Epigenetici nelle cellule Cancerose.....	28
1.3.2 RNA Interferente	29
1.3.3 Il processo molecolare, Funzione e significato evolutivo.....	32
1.3.4 Interferenza Proteomica nel cancro	33
1.4 Il cancro dal punto di vista dei biomarcatori.....	36
1.4.1 Le patologie genetiche ed epigenetiche secondo l'analisi, il rilevamento e la diagnostica dell'approccio genomico e proteomico	37
1.4.2 Preparazione del campione e arricchimento delle cellule patogene.....	38
1.5 Tecnologie innovative di biosensori per l'analisi delle patologie genetiche ed epigenetiche	39
1.5.1 Bio-sensori e stato dell'arte	40
1.6 Le tecnologie emergenti del biosensing.....	44
1.7 Le sfide nel passaggio dei biosensori ai test oncologici point-of-care.....	45
1.8 Conclusioni	46

CAPITOLO 2 BIO-SENSORI IMPEDIMETRICI LABEL-FREE DETECTION E LABEL-BASED DETECTION: TEORIA BASE ED APPLICAZIONI MEDICHE/GENOMICHE, BIOLOGICHE E IDENTIFICAZIONE DEI MATERIALI ORGANICI/INORGANICI	47
2.1 OME design base dei biosensori	47
2.2 Eterogeneità dei biosensori	50
2.3 Elementi di bioriconoscimento (E-BRs)	52
2.3.1 Enzima	53
2.3.2 Anticorpo	53
2.3.3 Aptamero	54
2.3.4 Biosensori ad acido nucleico	54
2.3.5 Cellule e tessuti	54
2.3.6 Polimeri a impronta molecolare (MIP)	54
2.4 Trasduttore	55
2.4.1 Biosensori ottici	55
2.4.2 Biosensore medicale	57
2.4.3 Biosensori elettrochimici	58
2.5 Nanomateriali a supporto della ingegneria di superficie	61
2.5.1 Funzionalizzazione dei nanomateriali nella ingegneria di superficie	64
2.5.2 Caratterizzazione di nanomateriali ed elettrodo di rilevamento	66
2.5.3 Studio delle prestazioni analitiche dei biosensori	72
2.5.4 Sviluppo della sonda per il biosensing	75
2.5.5 Aspetti salienti di studio nella realizzazione dei biosensori	76
2.5.6 Sensori basati su superfici anti-fouling	76
2.5.7 I nanozimi	77
2.6 Conclusioni	77
CAPITOLO 3 SPETTROSCOPIA DI BIO-IMPEDENZA: NOZIONI E APPLICAZIONI IN BIOFEVI	79
3.1 Aspetti teorici del Bio-EIS	79
3.1.1 Immittanza o limitazione elettrica, un aspetto fondamentale	80
3.1.2 Concetto di circuito equivalente nella definizione di immittanza	82
3.2 I modelli di immittanza nella bioelettronica	85
3.2.1 Doppio strato elettrico nel circuito EIS	86
3.2.2 Dispersione della capacità del doppio strato	90
3.2.3 Interfaccia metallo/elettrolita/cellula	93
3.3 Dalle teorie e tecniche sperimentali di spettroscopia di impedenza alla ideazione del dispositivo BioFEVI	95

3.3.1 Approcci nel dominio della frequenza.....	97
3.3.2 Metodi del dominio del tempo.....	98
3.4 Sintesi delle applicazioni EIS introdotte nel progetto BioFEVI.....	101
3.5 Conclusioni.....	109
CAPITOLO 4 BIO-EIS DAC-VI: A RELIABLE BIO-FINFETs EISDAC-VI IMMITTANCE BIO-ELECTRICAL TRANSDUCER FOR DYNAMIC ANALYSIS OF APOPTOSIS IN VIRAL COCHLEAR INFECTIONS.....	
4.1 Overview sul sistema di progetto elettronico.....	134
4.2 Sistema di spettroscopia a Bio-Impedenza BioFEVI.....	137
4.2.1 FUNZIONE E VANTAGGI DEL CIRCUITO	138
4.2.2 DESCRIZIONE DEL CIRCUITO.....	139
4.2.3 Configurazione dell'amplificatore a transimpedenza con SMT Resistore	142
4.2.4 Output Sensors - Configurazione del buffer per tensione ad alta impedenza ...	142
4.2.5 Scheda di acquisizione dati.....	143
4.2.6 Gestione dell'alimentazione.....	143
4.2.7 $\Sigma\Delta$ (ADC) e riferimenti.....	144
4.2.8 Trigger In and Trigger Out	145
4.2.9 Pulizia e manipolazione della scheda LLS	145
4.2.10 VERIFICA E TEST DEI CIRCUITI	146
4.2.11 Attrezzatura necessaria	146
4.2.12 Diagramma a blocchi funzionale del dispositivo ed esecuzione del software di test.....	146
4.3 Tecniche di misura con il modulo LLS.....	151
4.3.1 Misurazioni con il Keithley 2635B.....	151
4.3.2 Misura dell'integrazione capacitiva	154
4.3.3 Misura della capacità totale d'ingresso con un resistore di ingresso in serie....	155
4.3.4 Misura della capacità totale d'ingresso con un condensatore d'ingresso di Test	156
4.3.5 Misura di I_{B+} con capacità di ingresso nota	156
4.3.6 Misura ΔV_{Out} (Due Tensioni Di Uscita Di Prova)	160
4.4 Conclusioni	164
CONCLUSIONI	166
BIBLIOGRAFIA	168
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI DA FINALIZZARE NELLA FASE DI TEST PARZIALI (ID13.1) DEL PROGETTO BIOFEVI.....	174

ELENCO DELLE CERTIFICAZIONI E PROGETTI REALIZZATI	175
---	-----

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 3-1: Test BioFEVI - Proprietà elettriche di cellule e bioelettrodi	95
Tabella 4-1: Impostazione predefinita per TIA con resistore di vetro	140
Tabella 4-2: Impostazioni per la configurazione del buffer di tensione	142

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Piano per lo sviluppo di biosensori per test clinici sul cancro.	24
Figura 1-2: Colangio-RM, Istopatologia di Adenocarcinoma infiltrante.....	25
Figura 1-3: Consegna lentivirale di shRNA progettato e il meccanismo di interferenza RNA in cellule di mammifero.	30
Figura 1-4: Biogenesi dei piccoli RNA: i miRNA primari (pri-miRNA) sono trascritti nel nucleo e si ripiegano su se stessi come forcine che vengono poi tagliate nel nucleo da un complesso microprocessore per formare un pre-miRNA a forcina di ~60-70nt. Questo pre-miRNA è trasportato attraverso il complesso del poro nucleare (NPC) nel citoplasma, dove Dicer lo riduce ulteriormente a un duplex di miRNA di ~20nt (anche i pre-siRNA entrano nel percorso in questo passaggio). Questo duplex viene poi caricato in Ago per formare il "pre-RISC (RNA induced silencing complex)" e il filamento passeggero viene rilasciato per formare RISC attivo.	31
Figura 1-5: L'enzima dicer (Wikipedia).....	32
Figura 1-6: La segnalazione dipende dal contatto (a) necessita di un contatto fra e due cellule; le segnalazioni paracrina (b), autocrina (c) ed endocrina (d) dipendono da segnali rilasciati dalle cellule.	33
Figura 1-7: Panoramica schematica dei meccanismi di regolazione di CDH1 e delle vie di segnalazione mediate da E-cadherina coinvolte nel cancro gastrico. L'espressione di E-cadherina è deregolata a vari livelli nel cancro gastrico. Mutazioni inattivanti di CHD1, metilazione del promotore e regolazione trascrizionale, attraverso attivatori e repressori, sono frequentemente trovati nel cancro gastrico. L'espressione aberrante di E-cadherin promuoverà a sua volta la deregolamentazione delle vie di segnalazione mediate da E-cadherin, con un impatto sull'adesione cellula-cellula, la migrazione, l'invasione e la adesione, migrazione, invasione e sopravvivenza delle cellule. La rete di vie di segnalazione che si interseca con E-cadherina coinvolge, tra gli altri, Rac1, RhoA, EGFR, Notch, Bcl-2 e MMPs.	34
Figura 1-8: Disegno generale schematico dei biosensori.....	39

Figura 2-1: Design di base dei biosensori con i tre componenti più importanti, cioè B-RE, trasduttore e processore. In base al meccanismo di trasduzione, i biosensori sono classificati in biosensori ottici, meccanici ed elettrochimici.....	49
Figura 2-2: La mappa decisionale degli elementi di bioriconoscimento che può essere utilizzata per selezionare gli E-BR giusti nella progettazione iniziale dei biosensori.	52
Figura 2-3: Struttura molecolare di un anticorpo monoclonale	53
Figura 2-4: Rilevamento della trombina basato sulla fluorescenza	55
Figura 2-5: Superficie di rilevamento	55
Figura 2-6: diagramma di Jablonski che mostra l'eccitazione della molecola A al suo stato eccitato di singoletto ($^1A^*$) seguito da un passaggio intersistemico allo stato di tripletta (3A) che si rilassa allo stato fondamentale per fosforescenza.	56
Figura 2-7: Classe di elettrodo SPM label-free - Rappresentazione schematica della modifica superficiale elettrodo spm con inserimento dei nano bsa per aumentare la capacità selettiva del sensore e conseguente aumento dei valori Rct e concentrazione di proteine leganti di specie identificate.....	60
Figura 2-8: Classe di elettrodo GCE label-free – mostra il principio di rilevamento e la modifica della superficie su GCE per il rilevamento della serotonina.....	61
Figura 2-9: Scala di confronto delle bio-nanoparticelle.....	62
Figura 2-10: Natura, forma e sezioni delle nanoparticelle.....	63
Figura 2-11: La coniugazione biomolecolare efficace sulle NPs.....	64
Figura 2-12: Interazioni biotina-avidina su elettrodo in grafite per biosensing	65
Figura 2-13: Strategie di coniugazione applicate a Quantum Dots di semiconduttori fluorescenti comunemente usati in applicazioni di biosensing.	65
Figura 2-14: Voltammetria ciclica - Segnale di Input (a), Segnale di Output (b).....	70
Figura 2-15: Voltammetria differenziale a impulsi - Segnale di Input (a), Segnale di Output (b).....	70
Figura 2-16: Voltammetria a scala Segnale di Input (a) Voltammetria ad onda quadra Segnale di Input (b), Segnale di Output (e).....	71
Figura 2-17: Spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS) Segnale di Input (a), Segnale di Output (b).....	71
Figura 2-18: Cronopotenziometria (corrente costante).....	71
Figura 2-19: Sensibilità e Range dinamico.....	74
Figura 2-20: Curva di calibrazione	74

Figura 3-1: Schema di misura dell'immittanza. La tensione di eccitazione $V(\omega)$ viene applicata al campione con impedenza $Z(\omega)$, che determina una risposta di corrente $J(\omega)$ attraverso di esso. La tensione di eccitazione e la risposta di corrente vengono misurate in uscita dall'operazionale.....	80
Figura 3-2: Circuito equivalente RC, Nyquist Plot Ammettenza e metodo algebrico AM	82
Figura 3-3: EIS di un circuito RC seriale, diagramma di Bode e Nyquist d'impedenza ..	83
Figura 3-4: Circuito equivalente RC in parallelo, Nyquist Plot Ammettenza.	83
Figura 3-5: Diagramma di ammettenza locus di un circuito RLC seriale.....	84
Figura 3-6: Circuiti equivalenti ampiamente utilizzati e relative immittanze.....	85
Figura 3-7: Elettrodo ideale 2D a sinistra e ioni dell'elettrolita – Elettrodo SPE reale a destra	86
Figura 3-8: Schema per il problema di Gouy-Chapman-Stern e Schema circuito equivalente reale con W . electrode.....	87
Figura 3-9: Spettri d'impedenza sperimentali e simulati che mostrano un circuito equivalente di Randles semplificato per un sistema elettrochimico e Z_W di Warburg.....	91
Figura 3-10: Sul problema di Levie - Schema 2D poro dell'elettrodo (a)	92
Figura 3-11 Impedenza totale del poro (b).....	92
Figura 3-12: Rappresentazione schematica processi non-faradici su elettrodo planare....	92
Figura 3-13: Processo faradico su elettrodo planare	92
Figura 3-14: Rappresentazione schematica processi faradici su elettrodo planare	92
Figura 3-15: Schema che spiega la teoria del rilevamento dell'impedenza elettrica cellula-substrato (ECIS).....	94
Figura 3-16: Confronto delle forme d'onda della tensione e della corrente di eccitazione tra l'approccio nel dominio della frequenza (a) e l'approccio nel dominio del tempo (b)	96
Figura 3-17: Sorgenti di tensione a controllo di corrente – Convertitore parallelo ADC .	97
Figura 3-18: Principio di funzionamento dell'EIS adattivo.....	99
Figura 3-19: Petri su elettrodi planari per applicazioni ECIS	101
Figura 3-20: xCELLigence RTCA eSight	102
Figura 3-21: ECIS Model Z Theta	102
Figura 3-22: Evoluzione dell'impedenza di un elettrodo coperto di cellule (nero, arancio) e di un elettrodo vuoto (blu).....	102
Figura 3-23: Effetto dell'aggiunta di una tossina sull'impedenza metallo/elettrolita/cellula	104

Figura 3-24: L'effetto dell'aggiunta di una tossina sull'interfaccia metallo/elettrolita/cellula (Policlinico U.1° Roma).....	104
Figura 3-25: Registrazione cellulare tramite patch-clamp astrocitario	108
Figura 3-26: Impedenze in serie e in parallelo	109
Figura 4-1: Locandina presentazione progetto BioFEVI	111
Figura 4-2: GANTT Progetto di ricerca realizzazione dispositivo BioFEVI.....	136
Figura 4-3: Diagramma a blocchi funzionale della configurazione del sistema prototipale BioFEVI.....	137
Figura 4-4: Diagramma funzionale del sistema di misura femtoampere BioFEVI DO0407SDPZ Transducer	139
Figura 4-5: scheda LLS (BEB4530-1SI) Layer Stackup	139
Figura 4-6: Schema dettagliato della scheda LLS a Low Leakage (BEB4530-1SI).....	141
Figura 4-7: Configurazione TIA con resistenza SMT.....	142
Figura 4-8: Configurazione del buffer di tensione ad alta impedenza d'ingresso	143
Figura 4-9: Schema a blocchi semplificato dell'alimentazione.....	144
Figura 4-10: Diagramma a blocchi funzionale Test 1 del sistema prototipale BioFEVI	147
Figura 4-11: Piattaforma di misura Femtoampere (Software BFS-DO0407).....	147
Figura 4-12: Campionamento dati dal sistema BioFEVI.....	148
Figura 4-13: Campionamento dati con Open Input a 0,82 SPS	150
Figura 4-14: Sistema BioFEVI DO0407SDPZ Transducer con shield e Array di petri .	150
Figura 4-15: Schema semplificato per la misura di I_{B+} con il Keithley 2635b	152
Figura 4-16: Keithley 2635B SourceMeter.....	152
Figura 4-17: Scatola metallica (collegata alla messa a terra) che racchiude l'unità di misura BEB4530-1SI-BUF	153
Figura 4-18: Corrente di Bias dell'ingresso non invertente (I_{B+}) vs. tempo	153
Figura 4-19: Schema semplificato del metodo di integrazione capacitiva.....	154
Figura 4-20 a, b: Metodo di misura dell'integrazione capacitiva - scatola di prova e connettore triax	154
Figura 4-21: Misura della capacità totale d'ingresso con un resistore in serie di ingresso	155
Figura 4-22: Misura della capacità totale d'ingresso con un condensatore di test	156
Figura 4-23: Tensione di uscita rispetto al tempo	158
Figura 4-24: Corrente capacitiva vs. tempo	158

Figura 4-25: Capacitanza parassita di ingresso della scheda utilizzata per misurare la corrente di bias di ingresso.....	159
Figura 4-26: I_{B-} Schema di misurazione	160
Figura 4-27: V_{out1} vs Time.....	162
Figura 4-28: I_{B-} vs Time	162
Figura 4-29: V_{out2} vs Time	162
Figura 4-30: Resistenza di retroazione (R_{F1}) misurata rispetto al tempo	162
Figura 4-31: I_{B+} Schema di misurazione	163

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

LPPA	Laboratorio di Progettazione e Prototipazione Avanzata.
NANO-S	Sensore basato su matrice nano-strutturata.
IC	Circuito integrato.
BIOFEVI	Un progetto sperimentale di ingegneria biomedica nella rigenerazione anatomica e funzionale delle cellule uditive [...]. BioFEVI è una tecnologia di Biorilevamento e Genomica.
I _B	Media delle correnti di polarizzazione d'ingresso.
CTC	Cellule Tumorali Circolanti.
RNAi	Interferenza o quelling dell'RNA [...] in grado di interferire (e spegnere) l'espressione genica.
RNA	Acido Ribonucleico.
mRNA	RNA messaggero
sRNA	Short interfering RNA
MIRNA	Micro RNA (molecole endogene corte)
shRNA	Short hairpin RNA
DNA	Acido desossiribonucleico
TSGs	Gene anti-oncogeno soppressore tumorale
RT-PCR	Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi)
S-BC	Sensibile a bassa concentrazione
OME	Optical, Mechanical, Electrical Design base
AuNP	Nanoparticelle di oro
E-BR	Elemento di bio-riconoscimento

NP	Nano particelle
SAM	Monostrato assemblato
NP	Nano particelle

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Globalmente possiamo affermare che nell'ultimo decennio si è assistito ad un forte sviluppo tecnologico nel campo dei sensori integrati. La spinta verso l'integrazione, partita dai sensori di tipo inerziale, coinvolge ad oggi una vasta categoria di sensori, quali ad esempio i sensori dedicati all'identificazione di specie chimiche in fase liquida o in fase aeriforme, che destano interesse in molti campi: controllo dei processi produttivi, controllo qualità, **medicina**, **discipline forensi**, controllo dell'inquinamento, difesa ecc., (Lang, et al., 2021).

Tuttavia, a dispetto di quanto avvenuto per i sensori, gli strumenti per l'acquisizione dei dati forniti da questi dispositivi non hanno ricevuto la stessa spinta verso l'integrazione. Letture accurate e affidabili dei sensori richiedono di ricorrere a strumentazione da laboratorio, in quanto gli attuali dispositivi integrati non rispondono alle reali necessità delle tecniche di misura comunemente utilizzate (ad es.: voltammetria ed **impedenziometria** a tre elettrodi ecc.). Di fatto, ad oggi non esistono dispositivi integrati di tipo commerciali in grado di sostituire efficacemente la strumentazione da laboratorio. In letteratura è possibile trovare alcune proposte a riguardo, ma comunque soggette a limiti che richiedono lo sviluppo di soluzioni differenti (Bonato, et al., 2010), (McMahon, et al., 2008).

L'idea di Progetto NANO-S che ha dato vita allo sviluppo di una innovativa strumentazione integrata per misure di impedenza ad alta sensibilità su nano-sample, nasce anche dai rilevanti progressi in termini di miniaturizzazione, resi possibili dalla tecnologia dei circuiti integrati, che permettono di implementare sofisticati sistemi di misura su chip che sono in grado di realizzare, in un componente di pochi millimetri, la maggior parte delle funzioni disponibili con gli strumenti standard realizzati a componenti discreti.

Dunque l'integrazione di circuiti non permette solamente di sviluppare sistemi in parallelo su vasta scala, altrimenti troppo complessi e ingombranti per essere gestiti, ma è spesso anche la soluzione per migliorare significativamente la sensibilità dei sistemi di lettura che sono progettati per studiare, come in questo caso il mondo micro e nanoscopico.

La sensibilità è infatti fortemente legata alla capacità (degli elettrodi e dello strumento) all'ingresso del sistema di misura, C_{IN} che in pratica definisce il fondo di rumore dello strumento ne condiziona la progettazione nel seguente modo: un IC bondato ad un nano-

elettrodo con una capacità di ingresso di poche centinaia di femtofarad [fF] permetterebbe un miglioramento di circa un fattore x100 della sensibilità, se comparato ad un setup costruito con uno strumento da banco, con connessioni via cavo ed una capacità di ingresso di circa 10pF. Anche se fondamentale, la miniaturizzazione della catena di preamplificazione non è di per sé sufficiente, ma deve essere associata con un setup ed un sensore appositamente progettati. Il setup è stato pensato così da permettere di minimizzare le connessioni verso il campione da misurare (**Dispositivo sensoriale Sotto Test**), avvicinandolo il più possibile al circuito integrato;

Dunque, l'integrazione del sistema di misura insieme al DST implica lo sviluppo di sistemi compatti e specifici per ogni singola applicazione, dovendo questi soddisfare i molteplici requisiti (ad es.: biologici, chimici, ottici, meccanici ecc.) del DST stesso.

Il DST dovrà essere infine concepito e progettato affinché le sue caratteristiche si accordino il più possibile con i requisiti del sistema di lettura che determinerà la massimizzazione del segnale e rapporto segnale-rumore quando connesso all'elettronica di lettura, e la minimizzazione della capacità elettrica che esprime il circuito di ingresso.

Questo progetto rappresenta una sfida relativa alle misurazioni di **impedenza** su scala nanometrica e porterà alla nascita di una nuova gamma di applicazioni. Dunque, la tecnica di misurazione che verrà presentata in questa dissertazione, se adattata al micro e nano-scala, potrà fornire nuovi strumenti per le applicazioni industriali e per le ricerche sempre crescenti in molti campi di studio emergenti, come la scienza dei materiali e le applicazioni **biomediche**, della **bioingegneria**, microfonica ed energetiche.

Di seguito si riporta una sintesi della prima fase sulle tre di progetto individuate per il LPPA che sono state sviluppate nel corso dei tre anni di Dottorato. In un'ottica di Project Management riportiamo queste tre fasi di progetto inerenti la Pre-produzione, Produzione e Post-produzione dei metodi, analisi, e prototipi da realizzare o già realizzati che vanno a sviluppare l'idea di progetto LPPA, come segue:

1. **Fase di Pre-Produzione:** questa fase prevede attività di ideazione, studio, analisi funzionale e tecnica dei dispositivi da ideare o già ideati per il settore della Bio-sensoristica ed elettronica di Trasduzione ed acquisizione dati:

- *Ambito Sensoristico*

BIO-SENSORI – Elettrochimici (Prototipo per BioFEVI):

- Progettazione di Bio-sensori per l'analisi dei parametri Biologici/Genetici nelle applicazioni Biomediche in Real-Time per la rilevazione dei metaboliti cellulari, monitoraggio del cancro e rilevazione dei tumori nella

fase pre-oncogena, rilevamento degli agenti patogeni, e rilevamento di piccole molecole nucleotidiche di Biomarcatori e indicatori prognostici specifici anche inferenti le malattie rare;

MATERIALI INNOVATIVI PER BIO-SENSORI (Prototipo per BioFEVI):

➤ Progettazione di una nuova classe di matrici base per Bio-sensori elettrochimici, chimici e Spintronici nanocompositi di nuova generazione.

- *Ambito Elettronico di Trasduzione e acquisizione dati*

TRASDUTTORI – Elettronico (Prototipo per BioFEVI):

➤ Progettazione di una struttura di Look-in di amplificazione dei segnali di Bio-sensing per l'analisi dei parametri Biologici/Genetici;

SCHEDE DI ACQUISIZIONE DATI – Elettronico (Prototipo per BioFEVI):

➤ Progettazione di una struttura di Transimpedenza e Acquisizione dati quale interfaccia per i Trasduttori collegati ai Bio-sensori.

In questa dissertazione non verranno considerate le ultime due fasi cioè quelle inerenti alla Produzione e Post-Produzione in quanto il dispositivo è in uno stato Beta prototipale.

Il progetto di ricerca si incentra sui fondamenti delle misure di impedenza (Sistema NANO-S), evidenziando i requisiti per una configurazione versatile e sensibile che porteranno alla luce le differenze tra misurazioni macro, micro e nano dei sensori da sviluppare o già sviluppati per il contesto Biomedico/Bio-ingegneristico.

Il progetto di ricerca NANO-S, si incentra sullo sviluppo di strumentazione per misure ad alta sensibilità, quindi si sostanzia nello sviluppo della catena di preamplificazione dell'IC (In Circuit), ma anche sullo sviluppo del setup circuitale e del DST.

Il **primo lavoro** svolto, presentato nel Cap. 2, si incentra sullo sviluppo di Bio-sensori impedimetrici Label-free detection e Label-based detection per applicazioni Mediche/Genomiche, biologiche e identificazione dei materiali organici/inorganici.

Il **secondo lavoro** svolto, presentato nel Cap.4, si sostanzia sullo sviluppo di un amplificatore a transimpedenza, realizzato con una struttura molto particolare, con due canali di modulazione/amplificazione/demodulazione integrati all'interno di un anello di retroazione, e la possibilità di configurare più amplificatori operazionali in modalità di Crosspoint Multiplexer in entrata al modulo di Transimpedenza ideale per l'analisi in Microarrays di specie nucleotidiche. Questa tipologia di struttura sarà costituita da particolari amplificatori operazionali con una corrente di polarizzazione di ingresso (I_B) a livello di femtoampere (10^{-15}) e una tensione di offset ultra bassa. Le sue correnti di polarizzazione d'ingresso ultra basse

sono testate in produzione a 25°C e 125°C per garantire che il dispositivo soddisfi i suoi obiettivi di prestazione in un'applicazione di sistema.

Il **terzo lavoro** svolto, presentato nel Cap.4, concerne lo sviluppo definitivo del dispositivo medico prototipale denominato Bio-FinFETs EISDAC-VI (Bio-FEVI), il quale sarà costituito da tutte le componenti inerenti la struttura di Transimpedenza, Acquisizione dati, Trasduzione e rispettivi Bio-sensori, saranno parte integrante del dispositivo medico prototipale BioFEVI che verrà impiegato nelle applicazioni di screening Medico/Genomico e biologico.

Capitolo 1

SPETTROSCOPIA DI BIO-IMPEDENZA: APPLICAZIONI IN BIOLOGIA E MEDICINA

Il settore della diagnostica molecolare del cancro (o tumore o neoplasia o immunitarie T2) e di molte altre malattie anche rare basata su bio-sensori è un settore interdisciplinare molto promettente. I bio-sensori hanno il potenziale per giocare un ruolo importante nella diagnosi precoce e nel trattamento di queste malattie Genetiche ed Epigenetiche attraverso la diagnostica molecolare man mano che queste tecnologie e la nostra conoscenza dei bio-marcatori molecolari afferenti a queste patologie avanzano. Mentre molti tipi di bio-sensori sono stati sviluppati e utilizzati in un'ampia varietà di impostazioni biomediche e altre impostazioni analitiche, i bio-sensori sono oggi largamente assenti nella rilevazione e nella diagnostica delle malattie Genetiche ed Epigenetiche. Lo scopo di questo progetto di ricerca è di aiutare a colmare il divario tra la ricerca e l'applicazione clinica. Ciò viene realizzato progettando e descrivendo una gamma di tecnologie di bio-sensori per la rilevazione e la diagnostica delle malattie Genetiche ed Epigenetiche con la speranza di facilitare l'integrazione delle tecnologie di bio-sensori nella pratica clinica di queste patologie.

1.1 Rilevamento e diagnostica di patologie Genetiche ed Epigenetiche

Il cancro (o tumore o neoplasia o immunitarie T2) consiste in più di 200 malattie distinte che colpiscono più di 60 organi umani. È la seconda causa di morte nei paesi sviluppati. Il maggior numero di decessi deriva dai tumori del polmone, del colon, seno, pancreas, fegato e prostata, così come dalla leucemia (Intisar, et al., 2014), (Ismail, et al., 2013).

Il cancro è caratterizzato da una divisione cellulare incontrollata e illimitata, che porta all'invasione dei tessuti vicini e alle metastasi in organi lontani. Per sviluppare tecnologie per la diagnostica del cancro, è importante capire la complessità e gli elementi di base della biologia del cancro, che possono aiutare a definire obiettivi di rilevamento molecolare. Il cancro è una malattia genetica causata da cambiamenti o modificazione delle sequenze di DNA dei geni chiave. Questi cambiamenti si traducono in un'espressione genica o proteica

alterata, con conseguente composizione proteica alterata delle cellule tumorali. Man mano che le alterazioni del DNA si accumulano, le cellule tumorali diventano progressivamente isolate, portando infine alla proliferazione incontrollata del cancro. Allo stesso modo anche se pur con meccanismo diverso, un fattore epigenetico che determina una modificazione histonica all'interno del cromosoma può determinare un Health Endpoints che degenerano in Cancro, malattie autoimmuni, disordini mentali e varie forme di diabete. Quindi, lo sviluppo di un'efficace rilevazione e diagnostica di queste patologie genetiche ed epigenetiche si basa sull'utilizzo di bio-marcatori molecolari unici per ogni una di esse (ad es.: mutazioni del DNA, modificazione delle proteine o alterazione dell'espressione genica ecc.). Inoltre, l'emergere della cosiddetta medicina personalizzata e mirata (di precisione), che adatta il trattamento all'individuo (ad es.: prescrivendo farmaci antitumorali in base alla presenza o all'assenza di mutazioni specifiche), evidenzia sia la necessità di identificare bersagli molecolari specifici che le tecnologie per rilevare questi target anche nella fase preoncogenica (Surani, et al., 2007).

1.1.1 I Biosensori nel rilevamento e la diagnostica delle patologie genetiche ed epigenetiche

Il rilevamento dei Bio-marcatori molecolari nelle patologie genetiche ed epigenetiche come il cancro è fondamentale per la diagnosi e la formulazione di trattamenti efficaci. Mentre negli anni recenti molti tipi di bio-sensori sono stati sviluppati e utilizzati in una vasta gamma di ambiti biomedici e altre impostazioni analitiche, i bio-sensori sono in gran parte assenti nella rilevazione del cancro nella pratica diagnostica nonostante il fatto che queste patologie genetiche sono probabilmente le più complicate e sono molto prevalenti. I bio-sensori sono dispositivi analitici che utilizzano ligandi biologici detti anche bio-recettori, come antigeni/anticorpi, enzimi, cellule strutturate, acidi nucleici, DNA, peptidi e aptameri, per la rilevazione (Seema, et al., 2013).

Hanno due componenti principali: (1) un elemento di riconoscimento biologico (ligando) che facilita il legame specifico, attraverso una reazione biochimica di un bersaglio a un ligando, e (2) un'unità di conversione del segnale (Trasduttore) che misura il legame del ligando alla molecola bersaglio. I trasduttori, basati su vari principi fisici (come quello ottico, elettrochimico e opto meccanico), convertono le interazioni biochimiche tra il target e il ligando in un segnale misurabile. Altri elementi dei bio-sensori sono i sistemi di input/output e acquisizione dati per il funzionamento del dispositivo e i sistemi di micro-fluidica per gestire i campioni e i reagenti necessari per l'analisi. I bio-sensori hanno diversi vantaggi potenziali rispetto ad altri metodi di bio-detection per l'analisi delle malattie genetiche ed epigenetiche, specialmente per l'esecuzione di analisi complesse, grazie alla loro maggiore velocità e flessibilità di analisi. L'analisi rapida e in tempo reale può fornire informazioni interattive

immediate agli operatori sanitari, che possono essere incorporate nella pianificazione della cura dei pazienti affetti da cancro oppure essere utilizzata in uno screening esplorativo per identificare eventuali forme neoplastiche e/o specifici marcatori pre-oncogeni che identificano specifiche sovraespressioni (correlazione p53 e bcl2) /mutazioni in atto. Diverse specie di bio-sensori permettono analisi multitarget, che sono fondamentali per l'analisi di campioni di cancro complessi ed eterogenei. Altre caratteristiche di beneficio includono l'automazione e il ridotto costo dei test. Quindi, la diagnostica basata su bio-sensori può facilitare e migliorare lo screening delle malattie genetiche ed epigenetiche, aumentare i tassi di diagnosi precoce con conseguente miglioramento della prognosi (Della Corte, et al., 2020).

Ci sono numerosi tipi di bio-sensori di tipo elettrochimico, ottico, SPR, qRT-PCR, Colorimetrico ecc. che utilizzano varie modalità di trasduzione, e la scelta di un rivelatore adatto non è molto complessa pur basandosi su molti fattori, come la natura dell'applicazione, la molecola etichettata (se usata come nei bio-sensori Label-based), la sensibilità richiesta, il numero di canali (o area) di misura, il costo (in genere contenuto), la competenza tecnica e la velocità di rilevamento necessaria (da medio/veloce a real-time come nel BioFEVI oggetto di ricerca) (Jasmina, et al., 2017).

Tuttavia, nonostante le promettenti capacità dei bio-sensori, attualmente questi sono essenzialmente assenti per l'analisi clinica del cancro, in generale per le malattie Genomiche e nello specifico per lo screening pre-oncogeno dalla potenziale insorgenza patologica. Ciò è dovuto a una combinazione di fattori, tra cui una mancanza di conoscenza delle capacità dei bio-sensori da parte dei decisori, barriere normative, costi mantenuti elevati e metodi standard radicati nell'industria.

1.1.2 Obiettivi e approcci

Lo scopo di questa parte introduttiva è quello di descrivere gli elementi principali della rilevazione e della diagnostica delle malattie genetiche ed epigenetiche in generale, gli elementi di base della parte bio-sensoriale inerente il dispositivo BioFEVI e loro applicazioni alla rilevazione e alla diagnostica di queste malattie, sperando, in ultima analisi, di facilitare l'integrazione delle tecnologie dei bio-sensori nella rilevazione del cancro e nella pratica diagnostica. Si affronterà la diagnostica molecolare del cancro (ad esempio, genomica o proteomica) dal punto di vista dei bio-sensori label-free, label-based e della bio-rilevazione. Si spiegherà come vengono misurati e compresi tali marcatori molecolari usando i bio-sensori e verrà fornita una discussione sui vantaggi medici di una diagnostica del cancro rapida e accurata. Inoltre verranno descritte le principali tecnologie di bio-sensori (comprese quelle ottiche, elettrochimiche e opto meccaniche), concentrandosi sull'analisi del cancro e

sull'utilità clinica di queste tecnologie per la rilevazione e la diagnostica del cancro, la prognosi e il trattamento. Questa dissertazione renderà la tecnologia dei bio-sensori più accessibile e comprensibile a biologi molecolari, oncologi, patologi e ingegneri in modo che possa giocare un ruolo importante nella diagnosi molecolare precoce delle patologie genetiche ed epigenetiche.

1.2 Bio-ingegneria e bio-sensori

La descrizione dei concetti di base afferenti al cancro (o tumore o neoplasia o immunitarie T2) fornirà un'introduzione di carattere bio-ingegneristico inerente lo sviluppo di tecnologie per il rilevamento e la diagnostica del cancro. Questa dissertazione include anche un'introduzione molto generale ai biosensori. Il cancro (o tumore o neoplasia o immunitarie T2) sono malattie complesse, quindi lo scopo è quello di dare una panoramica delle principali questioni che potrebbero avere un impatto sullo sviluppo della tecnologia dei biosensori in una ottica di BioFEVI. I principali elementi necessari per adattare i biosensori ai test clinici sul cancro sono riassunti nella Figura 1.1. Per sviluppare la tecnologia dei biosensori per il cancro (o tumore o neoplasia o immunitarie T2), i biomarcatori e indicatori prognostici di queste patologie genetiche ed epigenetiche identificati dalla ricerca di base e clinica e dalle analisi genomiche e analisi genomiche/proteomiche devono essere prima convalidati. L'identificazione di biomarcatori e indicatori prognostici ad alta sensibilità e ad alta specificità è la più grande sfida per la diagnostica di queste patologie come anche per quelle immunitarie di tipo 2. L'obiettivo chiave è quello di affrontare gli aspetti biologici delle malattie genetiche ed epigenetiche che possono portare alla scoperta di nuovi biomarcatori e indicatori prognostici, le loro interazioni la loro espressione classificandoli quindi essere capaci mediante il dispositivo BioFEVI di predire potenziali e specifiche formazioni neoplastiche, displastiche o comunque intercettare specifici biomarcatori e indicatori prognostici peculiari per ogni possibile patologia già nella fase pre-oncogenica. I ligandi e le sonde sono necessari per l'identificazione di biomarcatori e indicatori prognostici convalidati che possono essere combinati con i trasduttori per produrre biosensori per i test clinici relativi a queste forme patologiche.

Altri elementi importanti sono la preparazione del campione preparazione dei campioni e il protocollo "tecnico" per i test. Come mostrato nella sintesi di Figura 1.1, i test sul cancro center-of-care richiede l'integrazione e l'automazione della tecnologia, nonché lo sviluppo di metodi di preparazione del campione (Bonuglia, et al., 2021).

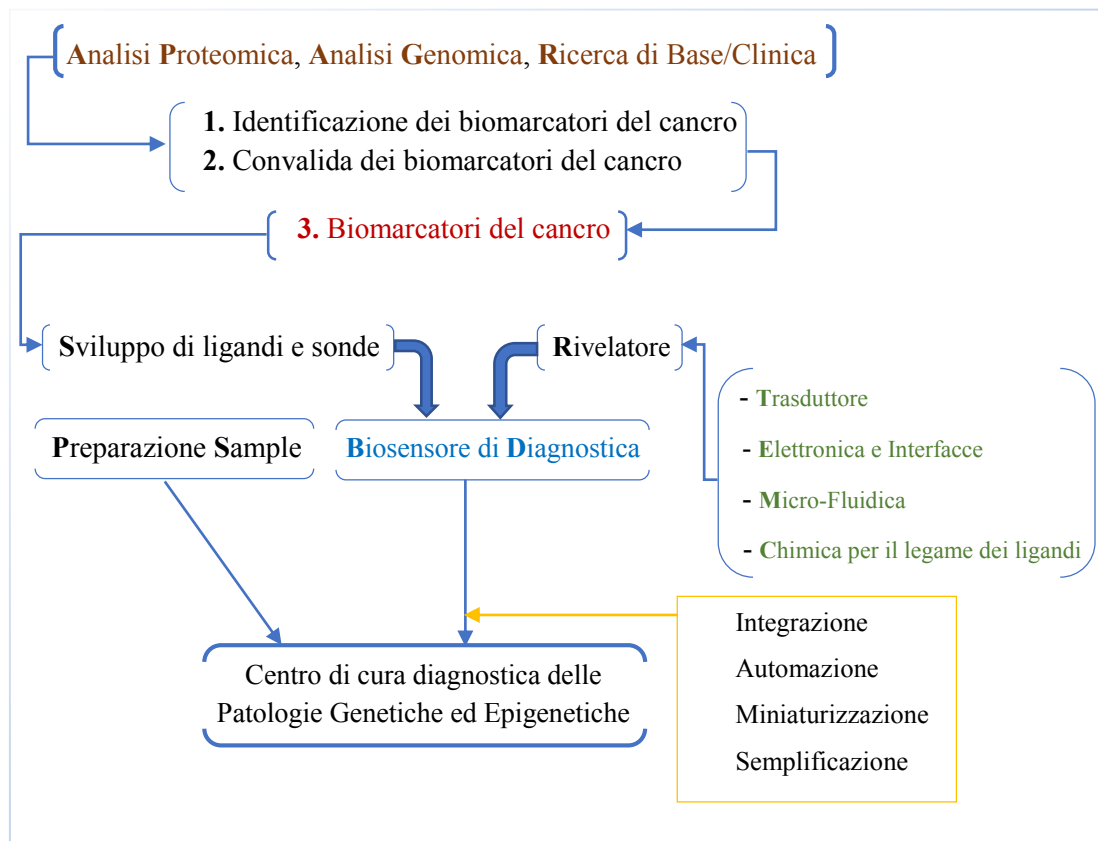


Figura 1-1: Piano per lo sviluppo di biosensori per test clinici sul cancro.

1.2.1 Peculiarità dei tumori infiltranti e numeri del cancro nel mondo

Le neoplasie sono escrescenze tissutali che sfuggono ai meccanismi di controllo della proliferazione regolare. La neoplasia maligna, cancro, deriva dall'accumulo graduale di alterazioni molecolari multiple a livello genomico (genetico ed epigenetico), trascrizionale, traslazionale e post-traduzionale. Il Cancro consta di più di 200 malattie distinte che colpiscono oltre 60 organi umani. I tumori maligni sono in grado di invadere i tessuti adiacenti, oltre a staccare gruppi di cellule dalla crescita primaria seguita dall'impianto e dalla proliferazione in siti distanti (processo metastatico). Le cellule tumorali subiscono una divisione cellulare anomala incontrollata, aumentando il numero totale di cellule tumorali e portando alla crescita del tumore primario. Le cellule tumorali spesso acquisiscono la capacità di infiltrarsi nei tessuti normali adiacenti. Inoltre, alcune cellule tumorali acquisiscono la capacità di penetrare le pareti venose o dei vasi linfatici e di muoversi attraverso la circolazione sanguigna o linfatica (CTC). Tali cellule possono ripenetrare attraverso le pareti dei vasi, entrando in tessuti remoti dove le cellule continuano a moltiplicarsi formando un nuovo

tumore metastatico (o secondario) (diffusione linfatica o ematogena). L'adattamento ai nuovi siti è un processo lungo che può durare alcuni anni e richiede diversi cambiamenti genetici.

Durante il processo di carcinogenesi multistep, i geni e l'espressione proteica in percorsi chiave risultano alterati, portando alla disregolazione dei meccanismi di controllo della proliferazione cellulare. L'aggressività clinica di un tumore maligno dipende da questi cambiamenti, che forniscono vantaggi di crescita al tumore rispetto ai tessuti normali adiacenti, nonché un potenziale invasivo e metastatico. Queste caratteristiche includono:

- Divisione cellulare illimitata;
- Invasione dei tessuti vicini attraverso la degradazione della matrice extracellulare (ECM);
- Maggiore motilità cellulare, favorendo la metastasi in organi distanti;
- Resistenza alla segnalazione anti-crescita;
- Evasione dell'apoptosi (morte cellulare programmata) che porta alla crescita autosufficiente (Docente, et al., 2022);
- Formazione sostenuta dei vasi (angiogenesi) che forniscono nutrimento e ossigeno alle cellule tumorali (Gelain, et al., 2014).

Una caratteristica generale del cancro è la sua complessità, i tumori sono istologicamente composti da una popolazione di cellule miste, comprese le cellule tumorali, cellule pre-maligne, epitelio normale, stroma e infiltrato infiammatorio come mostrato in Figura 1.2.

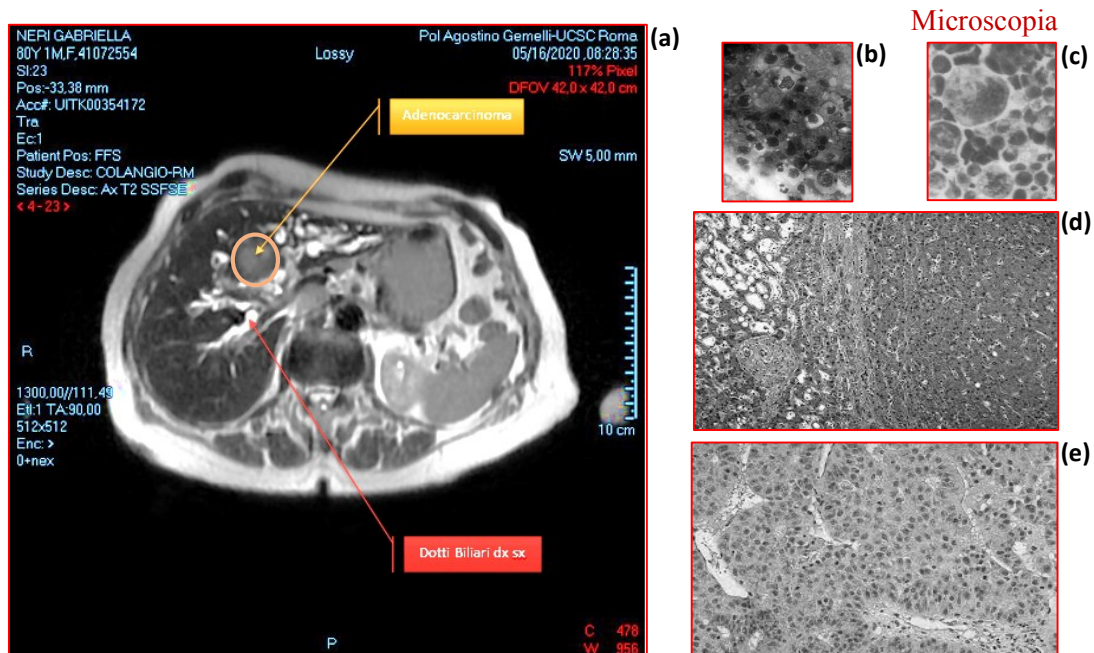


Figura 1-2: Colangio-RM, Istopatologia di Adenocarcinoma infiltrante.

Cancro del fegato che mostra popolazioni di cellule eterogenee nella stessa sezione. (a) sezione interna del fegato. Si possono vedere gruppi indipendenti di adenocarcinoma infiltrante e differenziati (d, e). Inoltre, aree microscopiche vicine di neoplasie epiteliali infiltranti (b). Marcato pleomorfismo nucleare (c).

Un'altra dimensione della complessità del cancro è il fatto che contiene molteplici alterazioni molecolari, con un gran numero di geni e mutazioni.

Il cancro è la seconda causa di morte nei paesi sviluppati, con un totale di 562.875 decessi registrati negli Stati Uniti nel 2007, che rappresentano circa il 23% di tutti i decessi negli Stati Uniti. Secondo un nuovo rapporto dell'American Cancer Society (ACS), nel 2022 ci saranno circa 224.080 nuovi casi di tumore e 73.680 decessi per tumore nei soggetti di colore. I tumori mammari e polmonari sono le principali cause di decesso rispettivamente per le donne e per gli uomini di colore quindi come possiamo notare senza considerare la restante popolazione di origine caucasica, ancora oggi i decessi dal 2007 restano invariati, ciò che invece cresce sono gli introiti dei filantropi e delle multinazionali che li asservono. Possiamo dire che a livello globale, una persona su 5 svilupperà un tumore nel corso della propria vita, Come dichiarato nel rapporto dal titolo "Global Cancer Statistics 2020", prodotto in collaborazione dall'American Cancer Society (ACS) e dall'International Agency for Research on Cancer (IARC). Nel rapporto sono analizzati i dati relativi a 36 tumori in 185 diversi Paesi del mondo, Secondo quanto si legge sulle pagine della rivista CA: A Cancer Journal for Clinicians, dove è stato pubblicato il documento, nel 2020 i nuovi casi di tumore nel mondo sono stati circa 19,3 milioni e i decessi a causa della malattia circa 10 milioni. C'è da sottolineare che questa fotografia non tiene conto della pandemia di Covid-19, che potrebbe mescolare le carte in tavola e modificare le tendenze nei prossimi anni. Non si può infatti escludere che in futuro si assisterà a una diminuzione a breve termine delle nuove diagnosi per via dell'interruzione o del rallentamento dei programmi di screening e a un aumento della mortalità e delle diagnosi di tumori in fase avanzata in alcuni contesti. Per molti anni il tumore del polmone ha occupato la prima posizione nella classifica dei tumori più frequentemente diagnosticati, ma il report 2020 mostra che il tumore del seno femminile detiene oggi questo primato. Con 2,3 milioni di nuovi casi stimati nel 2020, il tumore mammario nelle donne rappresenta infatti l'11,7 per cento delle nuove diagnosi, seguito dal tumore del polmone (11,4 per cento), del colon-retto (10,0 per cento), della prostata (7,3 per cento) e dello stomaco (5,6 per cento). Se si guarda invece alla mortalità, il tumore del polmone è al primo posto (18 per cento di tutti i decessi per cancro), seguito dal tumore colo-rettale (9,4 per cento) e da quello del fegato (8,3 per cento). Il tumore del seno femminile occupa il quinto posto in questa classifica (6,9 per cento). Nel rapporto I numeri del cancro in Italia 2020, pubblicato a cura di AIRTUM e AIOM, si sono stimate 377.000 nuove diagnosi di tumore in Italia per l'anno passato (esclusi i tumori della cute non melanomi), leggermente più numerose negli uomini (195.000) rispetto alle donne (182.000). Anche nel nostro Paese il tumore del seno femminile è il più diffuso, con poco

meno di 55.000 casi (14,6 per cento del totale), seguito da quello del colon-retto (43.702 casi; 11,6 per cento) e del polmone (40.882 casi; 10,9 per cento).

Anche se i trattamenti del cancro sono progrediti in modo impressionante da quando la guerra contro il cancro è iniziata nel 1971, il cancro rimane un potente killer, e l'aspetto più efficace dell'attuale arsenale medico è la diagnosi precoce.

Avendo preso coscienza già dal 1993 con la scoperta del primo micro RNA non codificante (in *C. Elegans*), oggi possiamo affermare con certezza che è possibile prevenire già nella fase pre-oncogenica la formazione di un potenziale tumore in uno specifico distretto afferente il corpo umano, per realizzare tutto ciò non basta la sola ricerca scientifica ma uno sforzo di volontà da parte anche degli stessi operatori sanitari in particolare mi riferisco agli oncologi e a tutto ciò che rappresentò e ancora oggi rappresenta la datata filosofia "Veronesi". Si necessita dunque di un atto di volontà ma soprattutto di **onestà intellettuale** da parte di tutti coloro che operano nel settore non solo oncologico ma che collaborano, ciascuno con la propria professionalità a fare in modo che il possibile progresso verso una nuova medicina di precisione venga attuato senza dovere per forza sottomettersi ai poteri forti che purtroppo spesso governano le scelte anche in tema di salute (Musk, *"La democrazia diretta"*, 2016).

1.2.2 *Il ruolo dei Biosensori nella rilevazione del Cancro*

I biosensori sono composti da un elemento di riconoscimento (ligando o recettore), un'unità di conversione del segnale (trasduttore), e un'interfaccia di uscita deputata alla presentazione del dato a fronte di uno specifico algoritmo che ne interpreta la mole di dati per poi restituirne quelli di interesse all'operatore diagnostico. I biosensori hanno il potenziale per giocare un ruolo chiave nel ridurre l'impatto del cancro attraverso la diagnosi precoce, che può portare a una sua migliore individuazione e diagnostica quindi ridurre l'impatto della malattia e migliorare la salute pubblica attraverso un trattamento precoce e personalizzato (medicina di precisione).

1.3 **Inferenza sul cancro dovuta a mutazioni ereditarie e somatiche**

Possiamo asserire con certezza che sia i tratti genetici ereditati che le mutazioni somatiche delle cellule possono contribuire al cancro. Le mutazioni somatiche delle cellule che compaiono nelle singole celle rappresentano la maggior parte delle patologie genomiche. Si ritiene che i fattori ambientali (come la dieta unita allo stile di vita e l'esposizione alle radiazioni ultraviolette o agli inquinanti cancerogeni) svolgono un ruolo importante nello sviluppo della maggior parte di queste patologie. In generale, l'esposizione agli agenti

cancerogeni speciali è a bassi livelli e i meccanismi di difesa di ogni persona sono unici. Esistono molti tipi di alterazioni genetiche che possono portare all'inizio del cancro. Le mutazioni legate al cancro possono derivare da cambiamenti in singole basi all'interno della sequenza del DNA, da errori di replicazione del DNA che aggiungono o eliminano basi all'interno di sequenze ripetute mono-nucleotidiche o di-nucleotidiche, dal cattivo funzionamento del sistema di riparazione dei geni (DNA mismatch) che portano ad alterazioni nella lunghezza di sequenze ripetitive semplici (instabilità dei microsatelliti), o dalla delezione o inserimento di sequenze di DNA che vanno da brevi sequenze a grandi porzioni del cromosoma (De Smedt, et al., 2015). Inoltre, molti cambiamenti cromosomici, compreso l'aumento o la diminuzione del numero di cromosomi, e riarrangiamenti cromosomici sono stati identificati nelle cellule tumorali.

1.3.1 *Cambiamenti Epigenetici nelle cellule Cancerose*

I cambiamenti *epigenetici* sono modifiche del DNA che influenzano l'espressione genica senza alterare le sequenze nucleotidiche del DNA. I cambiamenti epigenetici predominanti sono la metilazione della citosina, la deacetilazione degli istoni, la metilazione degli istoni e la perdita di imprinting (LOI) (Fleischer, et al., 2017).

Metilazione aberrante della citosina: La modificazione epigenetica più comune nel cancro è la metilazione della posizione C5 della citosina nel nucleoside desossicitosina. La metilazione (regolazione dell'espressione genica) silenzia i geni interferendo con il legame sequenza-specifico dei fattori di trascrizione o producendo effetti più generali sulla cromatina. Possiamo dire che, più della metà dei casi sporadici di cancro al colon con instabilità dei microsatelliti (brevi sequenze ripetute di DNA nel genoma) mostrano una ipermetilazione del promotore di un gene di riparazione del DNA mismatch. Silenziamento trascrizionale attraverso metilazione può avvenire in combinazione con altri meccanismi inattivanti, come una combinazione di ipermetilazione e perdita di eterozigosi in alcuni tumori al seno e alle ovaie (Crider, et al., 2012).

Mutazioni dell'acetilazione dell'istone: Modelli variati di acetilazione dell'istone sono presenti in molti tumori (Wakamori, et al., 2015). Un esempio eclatante è la classe di casi di leucemia acuta in cui una fusione della MLL (mixed leucemia di lignaggio misto) e dei geni dell'istone acetiltransferasi (CBP) porta a un'acetilazione degli istoni disturbata e silenziamento genico.

Metilazione aberrante dell'istone: Le metiltransferasi dell'istone metilano le lisine all'interno delle code degli istoni H3 e H4 (Yang, et al., 2011) che contengono un dominio SET conservato [68]. Le proteine del dominio SET sono regolatori della cromatina

multifunzionali. Alcuni tumori (quali, CRC e carcinomi epatocellulari che colpiscono le cellule del fegato) sono associati alla sovraespressione di enzimi SET-metilanti.

Perdita di imprinting: L'imprinting è un cambiamento epigenetico che si verifica nel gamete e causa una ridotta espressione di uno dei due alleli di un gene nelle cellule somatiche.

1.3.2 RNA Interferente

Oltre ai ruoli genetici ed epigenetici nel cancro, negli ultimi anni, il ruolo degli RNAi è diventato molto importante nella ricerca Genomica. L'RNAi coinvolge piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione del gene bersaglio post-trascrizionale. Questo meccanismo scoperto da pochi anni, attualmente in *Fase III* consente l'inibizione dell'espressione genica (Yamaguchi, et al., 2012) agendo attraverso la degradazione di specifici trascritti di RNA, interferendo così con la traduzione dell'mRNA o epigenetica con il silenziamento attraverso la metilazione del DNA diretta dall'RNA. L'RNA interferente corto (siRNA) riconosce bersagli specifici dell'mRNA attraverso l'accoppiamento di basi omologhe e provoca la loro degradazione mentre in modo analogo il micro-RNA (miRNA) silenzia i geni bersaglio degradando le molecole di mRNA o inibendo la loro traduzione. Questa interferenza genetica può influenzare l'invasione e la metastasi (Jiang, et al., 2015), ed è stato dimostrato che il miRNA può modulare la traduzione di diversi geni soppressori, tra cui PTEN, CD-44, SERPINB-5, o di geni pro-motore, tra cui RAS (Singh, et al., 2013), (Bracken, et al., 2009).

Ad esempio, una prole di microarray inerente un ampio gruppo di pazienti affetti da leucemia linfocitaria cronica (CLL) ha identificato un gruppo di nove miRNA (Mir-181a, Mir-155, mir-146, mir-24-2, mir-23b, mir-23a, mir-222, mir-221 e mir-29c) la cui espressione è stata associata a prognosi e progressione in CLL (Calin, et al., 2007), (Mraz, et al., 2009). Il mir-141 ha dimostrato di essere presente a un livello molto più elevato nei pazienti con cancro alla prostata suggerendo l'utilità di questo miRNA come marcatore ematico stabile per la rilevazione del cancro.

Allo stesso modo, diversi miRNA circolanti nel plasma di pazienti con tumori gastrici (GCs) (Sun, et al., 2014) hanno mostrato una potenziale utilità come marcatori tumorali complementari per la GC e specificamente per identificare l'origine di tumori primari sconosciuti (UPC).

Due tipi di piccole molecole di acido ribonucleico (RNA) - microRNA (miRNA) e small interfering RNA (siRNA) - sono centrali nell'interferenza RNA. Gli RNA sono i prodotti diretti dei geni, e questi piccoli RNA possono dirigere i complessi enzimatici per degradare le molecole di RNA messaggero (mRNA) e quindi diminuire la loro attività impedendo la traduzione, attraverso il silenziamento genico post-trascrizionale. Inoltre, la trascrizione può essere inibita attraverso il meccanismo di silenziamento pre-trascrizionale della RNA interference, attraverso il quale un complesso enzimatico catalizza la metilazione del DNA in posizioni genomiche complementari al siRNA o miRNA complessato. L'interferenza a RNA ha un ruolo importante nella difesa delle cellule contro le sequenze nucleotidiche parassite - virus e trasposoni, inoltre influenza anche lo sviluppo (Qureshi, et al., 2014), (Mack et al., 2007).

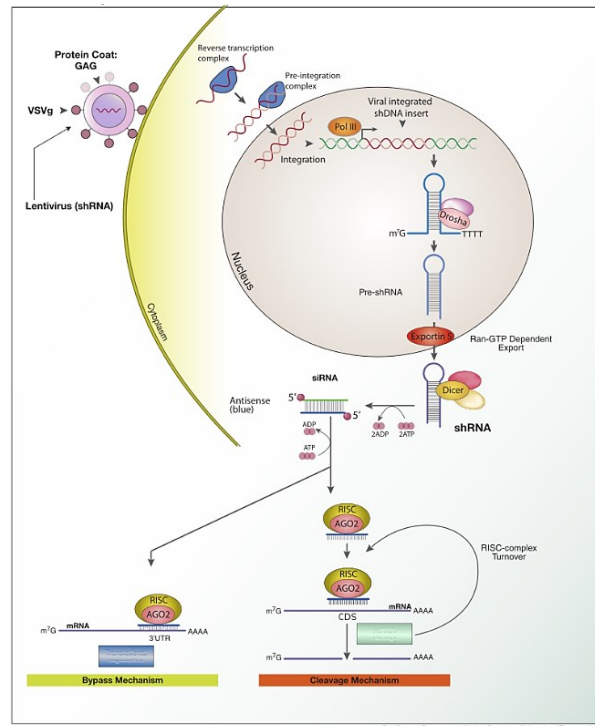


Figura 1-3: Consegna lentivirale di shRNA progettato e il meccanismo di interferenza RNA in cellule di mammifero. (Wikipedia)

Il meccanismo con cui il siRNA naturale causa il silenziamento del gene attraverso la repressione della traduzione avviene come segue:

1. Il dsRNA lungo (che può provenire da foricine, RNA complementari e RNA polimerasi RNA-dipendenti) viene scisso da un'endo-ribonucleasi chiamata Dicer. Dicer taglia il dsRNA lungo per formare RNA breve interferente o siRNA; questo è ciò che permette alle molecole di formare il complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC).
2. Una volta che il siRNA entra nella cellula, viene incorporato in altre proteine per formare il RISC.
3. Una volta che il siRNA fa parte del complesso RISC, il siRNA viene srotolato per formare siRNA a singolo filamento.

4. Il filamento che è termodinamicamente meno stabile a causa del suo appaiamento di base all'estremità 5' è scelto per rimanere parte del complesso RISC
5. Il siRNA a singolo filamento che fa parte del complesso RISC ora può scansionare e trovare un mRNA complementare
6. Una volta che il siRNA a singolo filamento (parte del complesso RISC) si lega al suo mRNA bersaglio, induce la scissione dell'mRNA.
7. L'mRNA è ora tagliato e riconosciuto come anormale dalla cellula. Questo provoca la degradazione dell'mRNA e a sua volta nessuna traduzione dell'mRNA in aminoacidi e quindi in proteine. Mettendo così a tacere il gene che codifica quell'mRNA.

Il siRNA è anche simile al miRNA, tuttavia, i miRNA sono derivati da prodotti di RNA stemloop più corti, tipicamente mettono a tacere i geni attraverso la repressione della traduzione, e hanno una più ampia specificità d'azione, mentre i siRNA tipicamente lavorano tagliando l'mRNA prima della traduzione, e hanno una complementarità del 100%, quindi una specificità di bersaglio molto stretta.

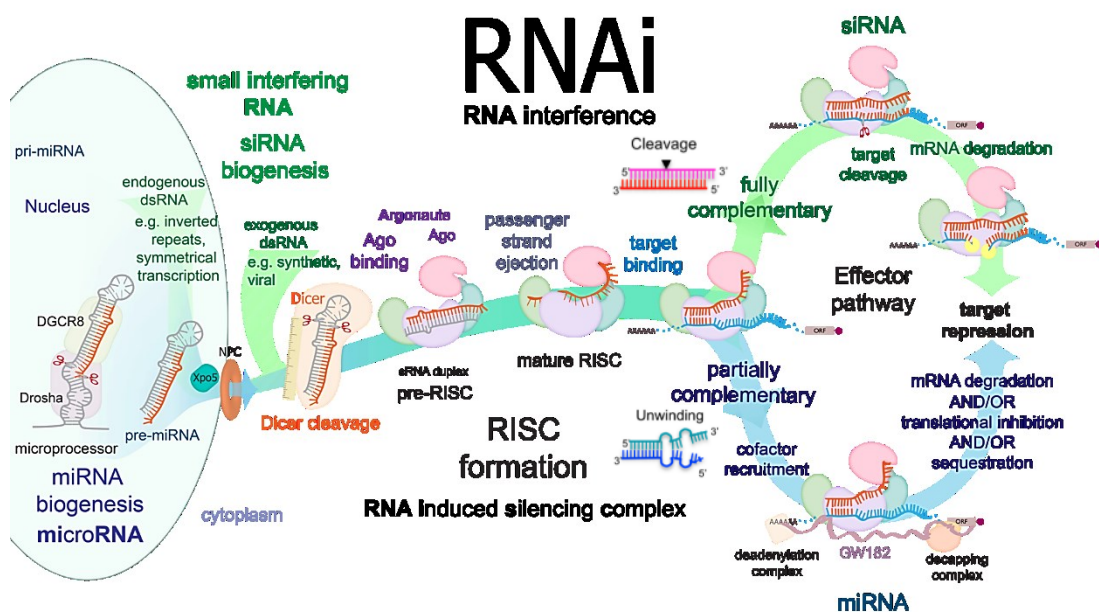


Figura 1-4: Biogenesi dei piccoli RNA: i miRNA primari (pri-miRNA) sono trascritti nel nucleo e si ripiegano su se stessi come forcine che vengono poi tagliate nel nucleo da un complesso microprocessore per formare un pre-miRNA a forcina di ~60-70nt. Questo pre-miRNA è trasportato attraverso il complesso del poro nucleare (NPC) nel citoplasma, dove Dicer lo riduce ulteriormente a un duplex di miRNA di ~20nt (anche i pre-siRNA entrano nel percorso in questo passaggio). Questo duplex viene poi caricato in Ago per formare il "pre-RISC (RNA induced silencing complex)" e il filamento passeggero viene rilasciato per formare RISC attivo. (Wikipedia)

1.3.3 Il processo molecolare, Funzione e significato evolutivo

La RNAi è un processo specifico e potente portato avanti dalla cellula. Sebbene non tutti i dettagli del processo stesso siano ancora chiari, sembra che il cosiddetto macchinario dell'RNAi, una volta individuata una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA), sia in grado di avviare il meccanismo della RNAi.

Attraverso un enzima (chiamato Dicer), la sequenza di dsRNA è tagliata in frammenti di lunghezza minore (19-21 paia di basi).

Il breve frammento di dsRNA (chiamato short interfering RNA, o siRNA) si associa ad un complesso enzimatico denominato RISC (dall'inglese RNA induced silencing complex, complesso silenziatore indotto dal RNA).

L'RNA a doppio filamento viene aperto, probabilmente da una elicasi: solo il filamento di RNA antisenso rimane associato a RISC, mentre il filamento senso viene degradato.

La RISC è ora attiva ed è in grado di scansionare molti mRNA presenti nel citosol fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisenso associato al complesso stesso.

Se l'appaiamento tra siRNA e mRNA è perfetto (o quasi perfetto), una componente della RISC (detta argonaute protein o Argo) è in grado di operare un taglio sull'mRNA. I due frammenti di mRNA risultanti, privo di cappuccio al 5' uno di coda di poliA al 3' l'altro, vengono così rapidamente degradati dalle RNAsi della cellula stessa. Se l'appaiamento, invece, non è perfetto, si pensa che la RISC sia comunque in grado di inibire la traduzione del gene. Sebbene il meccanismo di questo secondo evento non sia chiaro, sembra che possa essere molto diffuso negli animali.

Il meccanismo della RNAi è ampiamente utilizzato nel silenziamento dell'espressione genica: è stato osservato che certe regioni genomiche codificano per alcune brevi molecole di RNA (dette genericamente microRNA), in grado di ripiegarsi a formare una forcina (si parla in questo caso di shRNA). Quando gli enzimi della RNAi individuano tali molecole, le processano come precedentemente detto, quindi sono in grado di portare alla degradazione tutti gli mRNA complementari presenti nel citosol. La riduzione della presenza degli mRNA ha come ovvia conseguenza il calo di sintesi della proteina da essi codificata. Questo meccanismo è stato inizialmente individuato come JAW microRNA in *Arabidopsis thaliana*: questo RNA è coinvolto nella regolazione di alcuni geni che controllano la forma della pianta.

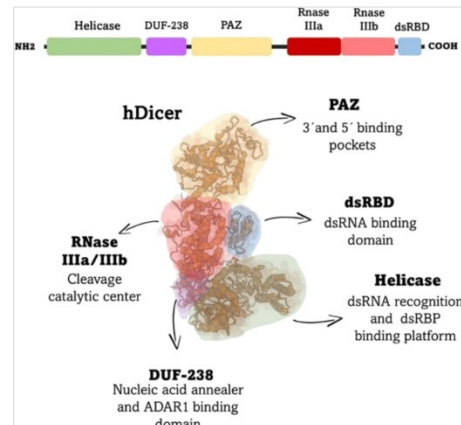


Figura 1-5: L'enzima dicer (Wikipedia)

In seguito, sono stati individuati numerosi altri microRNA dal meccanismo simile in numerosi organismi eucarioti (più di 300).

Un altro possibile significato della RNAi può essere legato al fatto che il ciclo vitale e replicativo di molti virus comprende un passaggio durante il quale il genoma virale è costituito di dsRNA. Ciò induce a pensare che il sistema della RNAi si sia evoluto anche per rispondere alle infezioni virali.

La RNAi è stata anche legata a numerosi processi cellulari, come la formazione della struttura del centromero (Volpe, et al., 2002) e della eterocromatina (Schramke et al., 2003).

1.3.4 Interferenza Proteomica nel cancro

La proteomica è lo studio su larga scala delle proteine che si fonda sull'utilizzo di nuove tecnologie basate sulla separazione delle proteine (ad esempio, gel 2D), l'identificazione delle proteine (a mezzo spettrometria di massa [MS]) e la bioinformatica (che ha la capacità di analizzare e ricostruire le sequenze proteiche). La proteomica permette lo studio del proteoma cioè l'intero insieme delle proteine espresse da un genoma, consentendo l'identificazione delle proteine coinvolte nel cancro, in questo modo diverranno più chiari i meccanismi ed i numerosi pathways che i miRNA esplicano in maniera simbiotica con queste proteine.

Il numero di queste proteine rilevanti per il cancro è molto più grande del numero di geni promotori e soppressori (Wittekind, et al., 2005), molti dei quali codificano regolatori trascrizionali e traslazionali. Per esempio, la trascrizione di CDH1 Antibody, che codifica il soppressore dell'invasione E-cadherina, è regolata da Snail, Slug e bHL, ricevendo segnali da più di 20 ligandi autocrini e paracrini attraverso molteplici vie di trasduzione del segnale (Christofori, et al., 1999), (Carneiro, et al., 2012).

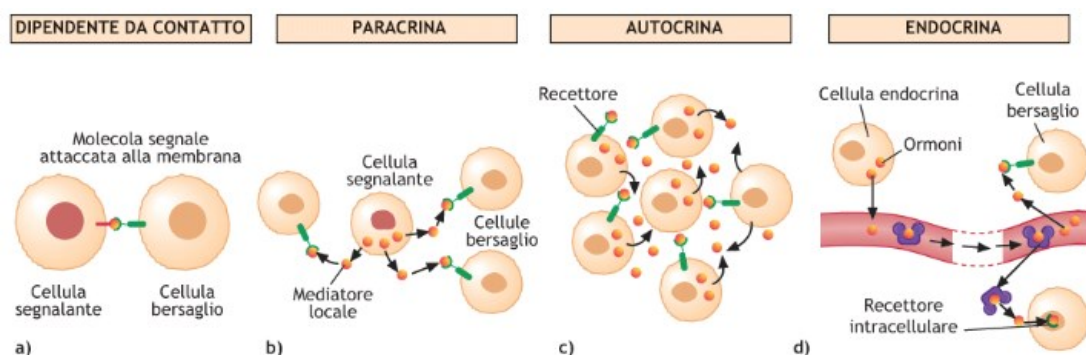


Figura 1-6: La segnalazione dipende dal contatto (a) necessita di un contatto fra e due cellule; le segnalazioni paracrina (b), autocrina (c) ed endocrina (d) dipendono da segnali rilasciati dalle cellule. (Wikipedia)

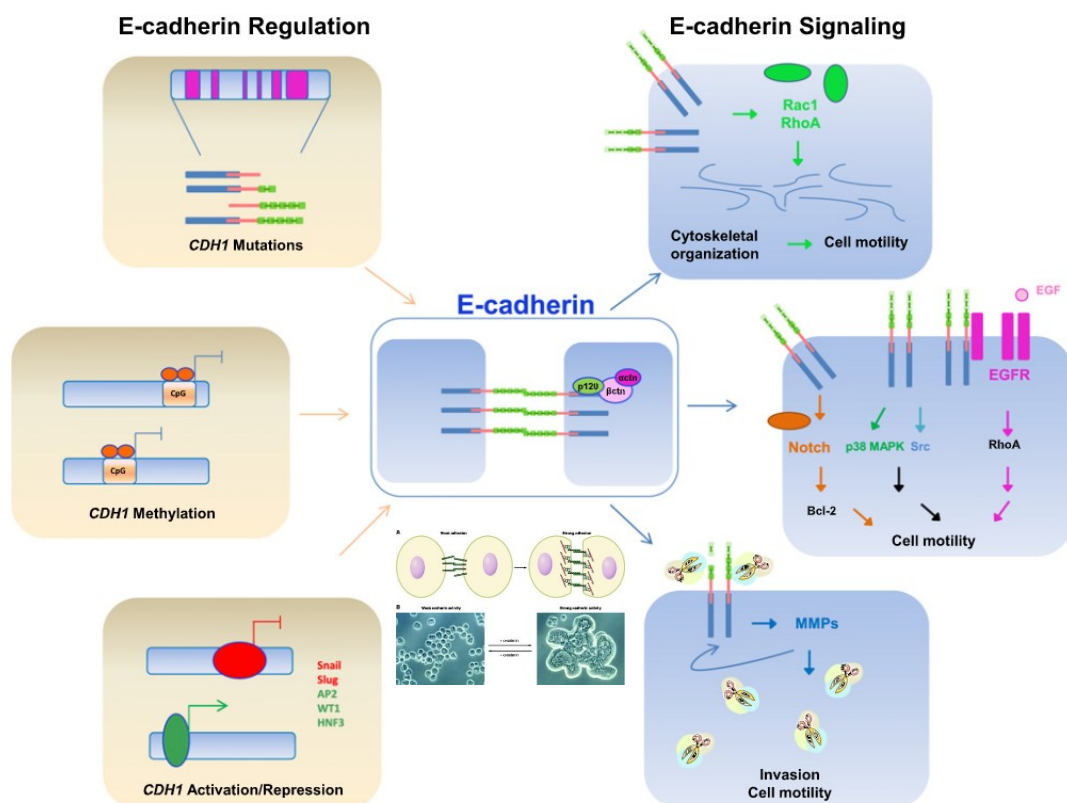


Figura 1-7: Panoramica schematica dei meccanismi di regolazione di CDH1 e delle vie di segnalazione mediate da E-cadherina coinvolte nel cancro gastrico. L'espressione di E-cadherina è deregolata a vari livelli nel cancro gastrico. Mutazioni inattivanti di CDH1, metilazione del promotore e regolazione trascrizionale, attraverso attivatori e repressori, sono frequentemente trovati nel cancro gastrico. L'espressione aberrante di E-cadherin promuoverà a sua volta la deregolamentazione delle vie di segnalazione mediate da E-cadherin, con un impatto sull'adesione cellula-cellula, la migrazione, l'invasione e la sopravvivenza delle cellule. La rete di vie di segnalazione che si interseca con E-cadherina coinvolge, tra gli altri, Rac1, RhoA, EGFR, Notch, Bcl-2 e MMPs.

Inoltre, ogni ligando è regolato post-trascrizionalmente (attraverso la fosforilazione e la sumoilazione). Queste vie complesse, che coinvolgono cascate di proteine interrelate (con molte ridondanze), sono il segno distintivo del cancro che può essere decifrato solo dalla proteomica perché

- Le proteine sono il punto finale dei processi biologici, e quindi, le proteine riflettono i cambiamenti patologici molto più direttamente dei cambiamenti nel DNA o nell'RNA.
- L'analisi dell'espressione genica non sempre si correla bene con l'espressione della proteina a causa della miriade di complessità nel processo di traduzione.
- Le modifiche post-trascrizionali (per esempio, fosforilazione, glicosilazione e sumoilazione) giocano ruoli critici nell'attività delle proteine e possono essere rilevati solo con studi di proteomica.

- Il vasto numero di interazioni proteina-proteina essenziali per i processi biologici può essere rilevato solo con studi di proteomica.
- La proteomica permette il monitoraggio diretto dei cambiamenti dinamici nello stato di una cellula o di un tessuto.

L'analisi proteomica è importante dal punto di vista clinico per la scoperta e la convalida di biomarcatori diagnostici, la scoperta di obiettivi molecolari per il trattamento, le decisioni terapeutiche e il monitoraggio dei pazienti.

A differenza della genomica, che è un campo relativamente maturo, la proteomica sta producendo solo lentamente biomarcatori clinicamente verificati.

Tuttavia, la proteomica ha un grande potenziale per sviluppare tali marcatori per la diagnostica del cancro.

Altri aspetti legati ai geni, pathways ed i cluster inerenti il cancro sono fondamentali da comprendere proprio per la complessità delle alterazioni di questi pathways nella tumorigenesi quando si sviluppano bio-sensori per l'analisi del cancro. I geni coinvolti nella carcinogenesi di solito appartengono a una delle due grandi categorie: *oncogeni*, che promuovono la proliferazione cellulare, e *TSGs*, che controllano la crescita cellulare. Tuttavia, i cambiamenti possono coinvolgere altri gruppi di geni che controllano funzioni non direttamente collegate alla proliferazione ma comunque fondamentali per la sopravvivenza e la progressione delle cellule tumorali. Questi geni possono influenzare processi rilevanti come l'invasione, l'angiogenesi, la riparazione del DNA, l'apoptosi (morte cellulare programmata) o la resistenza ai farmaci.

Per comprendere la complessità dei cambiamenti molecolari coinvolti nel cancro, è importante tenere a mente che molti geni possono giocare un ruolo in più di una di queste funzioni. Possiamo notare, la p53 un TSG che è inattivato in una proporzione significativa di tumori e gioca un ruolo in diverse vie di apoptosi dipendenti da p53 o coinvolto nell'inibizione mediata da p53 dell'angiogenesi tumorale. Inoltre, è stato dimostrato che p53 svolge ruoli centrali nella riparazione del DNA (Gu, et al., 1997) e nella regolazione della motilità cellulare. Si potrebbero citare molteplici esempi, quindi è importante tenere a mente che la maggior parte dei geni oncogeni e TSG possono, oltre alla proliferazione, influenzare diversi processi cellulari che forniscono al tumore vantaggi rispetto ai tessuti vicini. I metodi di sequenziamento su larga scala hanno permesso di analizzare i geni mutati che causano i comuni tumori umani. Tali analisi di mutazione per questi tumori umani hanno *rivelato mappe genomiche* del cancro composte da una piccola quantità di geni frequentemente mutati raggruppati in un numero limitato di percorsi molecolari principali.

L'approccio alla biologia dei sistemi viene utilizzata per identificare e meglio definire queste vie principali. Esistono molte classi di percorsi metabolici come la segnalazione, il ciclo cellulare, la morte cellulare e la riparazione del DNA. Tuttavia, in quasi tutti i tumori, sono coinvolti più percorsi, come ad esempio, per il cancro al pancreas e i glioblastomi.

1.4 Il cancro dal punto di vista dei biomarcatori

Gli organi di controllo e regolamentazione dei prodotti farmaceutici internazionali definiscono un biomarcatore come “Una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come un indicatore di processi biologici normali, processi patogeni o risposte farmacologiche a un intervento terapeutico”. I biomarcatori del cancro sono elementi caratteristici molecolari che possono essere rilevati in campioni di pazienti affetti da cancro. Questi biomarcatori anche detti firme molecolari, sono prodotti quando il cancro è presente, o dal tumore stesso o come risposta al tumore ad ogni modo recenti scoperte posizionano i biomarcatori ad un livello pre-oncogeno, neoplastico di una possibile o imminente patogenesi in determinati distretti del corpo umano. Possono includere DNA, modificazioni del DNA, RNA, proteine o modificazioni delle proteine, o altre molecole biologiche. I biomarcatori del cancro possono essere utilizzati in diversi modi, tra cui lo screening del rischio, l'individuazione, la diagnosi, la prognosi e il monitoraggio. Le tecnologie dei biosensori hanno un grande potenziale per l'identificazione, la caratterizzazione e l'applicazione clinica dei biomarcatori del cancro (Seema, et al., 2013), (Henry, et al., 2012).

Screening del rischio e bio-marcatori di rilevamento - Questi marcatori possono essere utilizzati per lo screening di individui asintomatici che sono a rischio di cancro, come il test per le mutazioni nel gene oncosoppressore che codifica per una proteina di suscettibilità al cancro del seno tipo 1. Enti di prevenzione hanno emesso raccomandazioni per lo screening delle mutazioni di questi geni. Anche se lo screening di routine per questi geni non è raccomandato, molti enti raccomandano lo screening delle donne con specifiche storie mediche familiari.

Bio-marcatori diagnostici e di monitoraggio della malattia - I marcatori sono utilizzati per l'identificazione, la caratterizzazione e il monitoraggio della progressione del cancro, compresi i marcatori utilizzati per identificare gli individui malati tra quelli che presentano sintomi vaghi o per distinguere tra sottoclassi di malattia. Questo include il PSA per l'individuazione e il monitoraggio della recidiva del cancro alla prostata o il CA-125 per il monitoraggio della recidiva del cancro alle ovaie.

Bio-marcatori prognostici e predittivi - I biomarcatori prognostici forniscono informazioni che si correlano all'esito nelle recidive dei tumori o la sopravvivenza dei pazienti indipendentemente dal trattamento che ricevono. Un esempio è la diffusione delle cellule tumorali ai linfonodi che si correla ad una maggiore probabilità di recidiva del tumore. I marcatori predittivi sono correlati alla risposta del paziente a una terapia specifica.

Analisi da biomarcatori - Le misure di performance chiave di un test del biomarcatore sono la **sensibilità** di rilevamento della malattia (misura la proporzione di effettivi positivi che sono correttamente identificati), la **specificità** del dosaggio (misura la proporzione di negativi che sono correttamente identificati), e il **valore predittivo** del test (proporzione di pazienti positivi per il biomarcatore che sono correttamente diagnosticati). Anche se molti studi abbiano cercato correlazioni negative tra endpoint clinici e biomarcatori del cancro, ci sono ancora pochi marcatori clinicamente provati che vengono utilizzati dagli oncologi per prendere decisioni di gestione dei pazienti. Questo è stato attribuito a popolazioni di pazienti variabili, caratteristiche del tumore, trattamenti, e metodi di analisi negli studi per scoprire, caratterizzare e convalidare i biomarcatori del cancro. L'istituto nazionale per il cancro sta ponendo un'enfasi significativa sulla ricerca per confermare e convalidare i biomarcatori per le applicazioni cliniche.

1.4.1 Le patologie genetiche ed epigenetiche secondo l'analisi, il rilevamento e la diagnostica dell'approccio genomico e proteomico

Le analisi proteomiche e genomiche generano grandi quantità di dati, ma questi approcci sono principalmente strumenti di ricerca che potrebbero non essere pratici per i test clinici di routine sul cancro a causa della loro complessità. Inoltre, come discusso in precedenza, i campioni di cancro sono molto spesso eterogenei (si veda ad esempio, la Figura 1.2) e contengono cellule cancerose e non cancerose e geni mutanti e geni di tipo selvatico. Per superare questo problema, sono stati sviluppati laser per micro-dissezione che permettono di selezionare per l'analisi solo le cellule cancerose. Oltre alla variabilità del campione e genetica, i protocolli articolati e ingombranti introducono problemi di riproducibilità ed inoltre devono essere eseguiti da tecnici altamente qualificati (Kristen, et al., 2012), (Yumiao, et al., 2013).

Tuttavia, molto spesso è possibile ottenere informazioni clinicamente utili da un numero più piccolo e gestibile di biomarcatori. Per esempio, un test che quantifica la probabilità di recidiva del cancro al seno in donne con una nuova diagnosi di cancro al seno in fase iniziale è stato sviluppato utilizzando solo 16 geni target analizzati utilizzando un test RT-PCR. Questo piccolo gruppo di geni bersaglio è stato scelto dopo l'analisi dell'espressione di 250 geni candidati selezionati da una varietà di fonti. Il test è stato in grado di predire il rischio di

recidiva della malattia e di prevedere se i pazienti beneficeranno o meno della chemioterapia nei casi di cancro al seno nodoso ed ER-positivo.

Quando un insieme di biomarcatori utili può essere ridotto a un piccolo numero di saggi, la rilevazione basata su biosensori diventa pratica e vantaggiosa per i test clinici sul cancro perché è più veloce, più facile da usare, meno costosa e meno tecnicamente impegnativa delle analisi microarray o proteomiche. Tuttavia, è ancora necessario un notevole sviluppo tecnico, in particolare per i biosensori basati sulle proteine, enzimatici, antigene/anticorpo, acidi nucleici e DNA oltre che bio-mimetici.

Come abbiamo visto, la carcinogenesi è il risultato di un accumulo di eventi che coinvolgono più vie e gruppi di geni (proteine, siRNA, miRNA), compresi i TSG, gli oncogeni e/o i geni di riparazione del DNA. Tradizionalmente, uno degli obiettivi principali degli studi molecolari che utilizzano campioni di tumori clinici è stato l'identificazione di marcatori individuali con potenziale utilità clinica. Anche se molti di questi marcatori clinici sono stati identificati e attualmente in uso, l'era genomica ha generato sforzi verso lo studio del modello generale del genoma, trascrittoma e proteoma in ogni campione.

Utilizzando tecniche che possono studiare rapidamente un gran numero di analiti per campione (cioè, high-throughput screening [HTS]), l'obiettivo è quello di identificare modelli di trascrizioni o proteine che hanno utilità prognostica, diagnostica o terapeutica. Molte tecniche HTS possono analizzare più campioni in ogni esperimento. Le tecniche HTS sono al centro degli attuali sforzi di scoperta e convalida dei biomarcatori del cancro. Firme tumorali utilizzando tecniche HTS sono state identificate a tutti i livelli molecolari, inclusi DNA, RNA e proteine, inoltre questo aspetto assume ancora più forza, valenza se si utilizza la tecnica della spettroscopia di impedenza elettrica (EIS) con particolare attenzione alle sue applicazioni biologiche e mediche, oggetto di questa dissertazione.

1.4.2 Preparazione del campione e arricchimento delle cellule patogene

La preparazione del campione rappresenta un grande ostacolo all'uso diffuso dei biosensori in applicazioni cliniche. Tradizionalmente, la diagnosi del cancro viene effettuata utilizzando il tessuto tumorale incorporato nel biosensore e tecnologie molecolari per la diagnostica del cancro o l'analisi di singoli biomarcatori nel sangue. Tuttavia, l'impiego della paraffina (miscela di alcani e idrocarburi) non è il metodo di conservazione ideale per il DNA, l'RNA e le proteine utilizzate in molte analisi basate su biosensori. Gli acidi nucleici recuperati da paraffina contenente i tessuti sono spesso significativamente degradati rispetto a quelli recuperati da tessuti freschi anche se la PCR è stata eseguita con successo in molti casi. Le proteine sono più difficili da recuperare da campioni inglobati nella paraffina rispetto agli acidi

nucleici, anche se sono stati descritti diversi metodi per l'estrazione e l'analisi di proteine diagnosticamente utili. L'analisi delle proteine è una delle più importanti applicazioni per i biosensori, e il fatto che le proteine non possono essere analizzate con i metodi convenzionali di fissaggio significa che devono essere analizzati campioni freschi o congelati.

Per ovviare a tale inconveniente il progetto BioFEVI verte proprio nella risoluzione di tali problematiche ed estende la sua attività di analisi Real-Time non solo alle proteine ma anche a tutte le specie genomiche attualmente utilizzate come bio-marcatori nelle patologie genetiche ed epigenetiche valutando concentrazioni, identificazione di specie relativamente a miRNA siRNA, antigeni/anticorpi, mRNA e DNA ed in fine misurare il numero di cellule aderenti agli elettrodi del sensore, stimare la vitalità delle cellule, studiare la motilità cellulare, le interazioni cellula/cellula, quantificare l'attività dei farmaci ecc.

1.5 Tecnologie innovative di biosensori per l'analisi delle patologie genetiche ed epigenetiche

Le tecnologie basate su biosensori hanno un grande potenziale per il rilevamento del cancro, la diagnosi, il monitoraggio e la guida del trattamento. I biosensori sono composti da un elemento di riconoscimento (ligando o recettore), un'unità di conversione del segnale (trasduttore) e un'interfaccia di uscita (il componente elettronico per interagire con lo strumento). Questo disegno generale (Figura 1.8) è comune a tutti i biosensori. I biosensori possono essere divisi in due tipi generali: (a) non catalitico (senza etichetta) biosensori utilizzati per la rilevazione diretta e (b) biosensori a rilevazione indiretta che spesso utilizzano un test catalitico per la rilevazione. In entrambi i casi, l'analita si lega in modo specifico all'elemento di riconoscimento. Nei biosensori a rilevazione indiretta, una molecola secondaria etichettata si lega poi all'analita bersaglio, e il sensore rileva gli effetti della molecola etichettata.

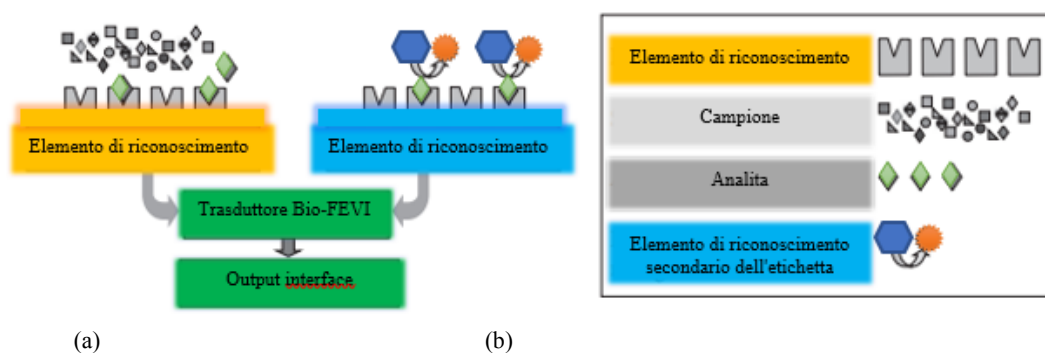


Figura 1-8: Disegno generale schematico dei biosensori.

1.5.1 *Bio-sensori e stato dell'arte*

I biosensori a rilevazione diretta come la risonanza plasmonica di superficie (SPR) sono biosensori in cui la reazione di riconoscimento viene misurata direttamente utilizzando varie proprietà fisiche. I metodi di rilevamento diretto sono privi di etichette, un fattore che semplifica e velocizza il rilevamento, mantenendo basso il costo del test. I biosensori a rilevazione indiretta, come i sensori elettrochimici, richiedono un ligando secondario marcato per la rilevazione del target. I ligandi secondari marcati sono spesso anticorpi coniugati a un enzima come la fosfatasi alcalina. Il sensore rileva la reazione catalitica effettuata dall'enzima. La necessità di un ligando secondario etichettato e il saggio “a sandwich” in due fasi (il legame del bersaglio al ligando primario e il legame del ligando secondario al bersaglio catturato) complicano il rilevamento. La tendenza degli ultimi anni va verso sistemi ad alta produttività con maggiore integrazione e miniaturizzazione che si avvicina al livello molecolare. Questa tendenza ha diversi vantaggi intrinseci perché sta portando alla produzione di dispositivi di maggiore capacità (più canali), più semplici sistemi di supporto, produzione di dispositivi meno costosi e tempi di risposta più rapidi. Un esempio di questa tecnologia emergente sono gli array di anticorpi, in cui gli anticorpi sono disposti in modo ordinato in formato bidimensionale su un supporto solido. Usando gli array di anticorpi, vari antigeni possono essere identificati dal loro legame con anticorpi specifici in posizioni note. Tali biosensori di array, combinati con un sistema microfluidico e un elemento di rilevamento, consentono un'analisi automatizzata di più analiti. L'uso di tali chip bio-sensoriali integrati può consentire un'analisi completa di un bio-specifico complesso, come il sangue o altri liquidi del corpo. I biosensori hanno diversi vantaggi potenziali rispetto ad altri metodi di analisi clinica del cancro, tra cui una maggiore velocità ed esattezza. I metodi rapidi e in tempo reale possono fornire informazioni più tempestive agli operatori sanitari per una diagnosi veloce. Inoltre, i biosensori permettono di automatizzare più misurazioni su un singolo campione, riducendo i costi. La diagnostica basata su biosensori ha il potenziale per espandere lo screening del cancro a costi ragionevoli e per migliorare i tassi di diagnosi precoce con conseguenti miglioramenti nella prognosi. Le tecnologie dei biosensori dovrebbero migliorare l'erogazione dell'assistenza sanitaria nella comunità e a favore delle popolazioni poco servite.

L'importanza dei Ligandi per l'analisi del cancro: L'elemento di riconoscimento, o ligando, è il componente biologico del biosensore che produce il segnale. Ci sono vari tipi di elementi di riconoscimento, che vanno da cellule intere a molecole relativamente piccole quali i miRNA. Gli elementi di riconoscimento possono essere divisi in due categorie generali e cioè elementi non catalitici (Figura 1.8a) e catalitici (Figura 1.8b). Elementi di riconoscimento non

catalitici, come recettori cellulari o anticorpi, sono spesso utilizzati per la rilevazione diretta (cioè, senza etichetta) biosensori in cui l'interazione viene misurata direttamente ed il segnale di uscita viene prodotto immediatamente. Molti biosensori sono stati sviluppati per l'analisi delle proteine, indicando il loro potenziale per il rilevamento di biomarcatori proteici del cancro.

Tuttavia, uno dei colli di bottiglia per l'analisi del cancro multitarget è la disponibilità di ligandi di riconoscimento anche se ad oggi si stanno facendo notevoli progressi nella mappatura e correlazione tra miRNA e patologie genomiche. Mentre gli anticorpi sono eccellenti ligandi in termini di forza di legame e selettività, sono costosi da produrre, incompatibili con alcuni approcci ad alta produttività e spesso hanno una durata di conservazione limitata. C'è stato un notevole interesse nella ricerca di alternative agli anticorpi, e questi sforzi sono ad oggi si sostanziano nella genomica. Quindi, diverse strade molto promettenti di indagine sono state perseguite, tra cui aptamers, peptidi, peptidi impalcatura, agenti leganti combinati derivati da ligandi a bassa affinità, e ligandi di chimica combinatoria oltre a Citokine e micro RNA. Gli aptameri sono acidi nucleici che legano le proteine e legano altre molecole con alta affinità. I peptidi possono essere selezionati da librerie phage display con alta affinità per un bersaglio. La costante di dissociazione di equilibrio del ligando (K_D) per gli anticorpi e alcuni aptameri ad alta affinità è dell'ordine di 10^{-9} M. Al contrario, altri ligandi come peptidi, peptidi scaffoldati e agenti leganti combinati hanno in genere K_D che sono da due a tre ordini di grandezza inferiore ($\sim 10^{-6}$ a 10^{-7} M). Una nuova generazione di ligandi ad alta affinità e versatili compatibili con i sistemi high-throughput è un elemento chiave per lo sviluppo e l'utilizzo dei biosensori

La trasduzione del segnale: I trasduttori sono i componenti fisici del sensore che rispondono al segnale del processo di bio-sensing e convertono la risposta in forma misurabile. I trasduttori si basano su una varietà di principi fisici e chimico-fisici, tra cui quelli dell'elettrochimica, la conducibilità elettrica, l'emissione di fluorescenza, la spettrometria di massa. I biosensori possono essere classificati come trasduttori diretti o indiretti. I trasduttori a rilevazione diretta, come i trasduttori SPR o con risonatore al quarzo, rilevano la presenza fisica del bersaglio legato a un elemento di riconoscimento. I metodi di rilevamento diretto sono privi di etichette, un fattore che semplifica e velocizza il rilevamento, mantenendo basso il costo del test. I biosensori a rilevazione indiretta, come i sensori elettrochimici, richiedono un ligando secondario marcato per la rilevazione del target. Data la complessità del cancro, i trasduttori per l'analisi del cancro devono essere capaci di *multiplexing* che permetterà l'analisi

di più analiti associati al cancro (tipi di cellule, proteine, mutazioni, alterazioni epigenetiche, ecc.) simultaneamente.

Trasduttori a rilevazione diretta: I principali tipi di trasduttori a rilevazione diretta sono biosensori ottici diretti, biosensori meccanici e transistor a field-effetto (FETs) e il nuovo nato, oggetto di questa dissertazione Bio-FinFETs EISDAC-VI Immittance Bio-Electrical Transducer (Bio-FEVI).

Trasduttori ottici a rilevazione diretta: I biosensori ottici diretti sono solitamente basati sulla fisica delle onde evanescenti e misurano i cambiamenti nelle interazioni della luce con la superficie del biosensore. Le interazioni molecolari nelle immediate vicinanze della superficie del trasduttore, come il legame dell'anticorpo e dell'antigene, provocano cambiamenti dell'indice di rifrazione che possono essere rilevati in diversi modi. I principali trasduttori ottici a misurazione diretta sono i biosensori SPR e a specchio risonante. Nei biosensori SPR, il ligando di riconoscimento (spesso un anticorpo) è immobilizzato sulla superficie del prisma. I cambiamenti all'interno della gamma del campo di plasmone (come il legame anticorpo-antigene) causano cambiamenti nella risonanza del plasmone. I biosensori a specchio risonante misurano anche i cambiamenti nell'indice di rifrazione, ma si basano su uno strato di alto indice di rifrazione invece di uno strato di rilevamento in oro 100 nm usato dalla SPR. La luce che entra nello strato risonante dal prisma è accoppiata agli eventi di legame sulla superficie attraverso il campo evanescente. Come nei biosensori SPR, gli eventi di legame sulla superficie del sensore possono essere misurati.

Trasduttori meccanici a rilevazione diretta: Oltre ai trasduttori ottici diretti, trasduttori meccanici come il cristallo risonante e il cantilever entrambi basati sulla dinamica della superficie del sensore possono essere usati come trasduttori di rilevamento diretto. Biosensori a cristallo risonante (noti anche come microbilancia a cristallo di quarzo (QCM), piezoelettrico o onda acustica) misurano i cambiamenti nella frequenza di risonanza acustica di un cristallo di quarzo a causa della massa legata sulla superficie del cristallo. I biosensori basati su cantilever sono trasduttori di recente sviluppo che misurano la frequenza vibrazionale dipendente dalla massa o i cambiamenti di stress di flessione sulla superficie del cantilever.

I ligandi possono essere attaccati covalentemente alla superficie del cantilever, e il cambiamento di massa indotto da eventi di legame target-ligando possono essere rilevati dai cambiamenti nella frequenza di risonanza o misurando la posizione del cantilever tramite metodi ottici (ad esempio, focalizzando un raggio laser sulla punta del cantilever per misurare la posizione).

Rilevamento diretto dei transistor a field-effect: I FET sono transistor comandati da cambiamenti nel campo elettrico. Una classe speciale di FET, chiamata FET sensibili agli ioni (ISFET), è utile come biosensori. I FET hanno una sorgente, un collettore e un gate. Recentemente, i FET sono stati fabbricati utilizzando nanomateriali (ad esempio, nanotubi di carbonio) per migliorare le prestazioni. In un FET, i ligandi sono immobilizzati sulla superficie del gate. I FET basati su nanotubi di carbonio a parete singola (SWNT) hanno mostrato un grande cambiamento di conduttanza in risposta a eventi di legame sulla superficie.

Trasduttori a rilevazione indiretta:

Come discusso in precedenza, la rilevazione indiretta richiede che l'analita target sia prima legato da una *molecola secondaria marcata*, per esempio, un anticorpo coniugato a un enzima come la fosfatasi alcalina. I principali tipi di trasduttori indiretti sono ottici ed elettrochimici. In entrambi i tipi, il sensore rileva la reazione catalitica effettuata dall'enzima come variazione di luce o variazioni elettriche. I biosensori a rilevazione indiretta sono molto sensibili, relativamente semplici e generalmente meno costosi dei sensori a rilevazione diretta, anche se utilizzano una molecola secondaria etichettata e tipicamente mostrano una risposta più lenta dei sensori a rilevazione diretta. Ci sono diversi tipi di biosensori a rilevazione indiretta, compresi i sensori fluorescenza-etichetta, chemiluminometrici, elettrochimici e potenziometrici indirizzabili alla luce. Biosensori con etichetta di fluorescenza: Nei dosaggi immunologici a sandwich con fluorescenza, le molecole di fluorocromo sono usate per etichettare gli anticorpi secondari. Quando il fluorocromo è eccitato, l'emissione può essere rilevata dal trasduttore del biosensore. In generale, i biosensori fluorescent-label possono rilevare analiti a concentrazioni basse, nell'ordine di 1-10 ng/mL. Diversi biosensori multicanale fluorescent-label sono stati sviluppati per testare la presenza contemporaneamente di più agenti patogeni e tossine. Si tratta di un tipo di strumento versatile adatto alla rilevazione di microbi e tossine basata su anticorpi. La fluorescenza può essere misurata in diversi modi, tra cui fotodiodi, fotomoltiplicatori (PMT), fototransistor, o dispositivi ad accoppiamento di carica (CCD) che misurano l'intensità di emissione su un'area.

Biosensori elettrochimici: I rivelatori elettrochimici misurano il trasferimento di elettroni dovuto a reazioni di ossidazione/riduzione catalizzate da un enzima come la fosfatasi alcalina o una reazione chimica misurata con un elettrodo adatto. I trasduttori elettrochimici comuni sono dispositivi amperometrici che rilevano le variazioni di corrente a potenziale costante, dispositivi conduttimetrici che rilevano le variazioni di conduttività tra due elettrodi (a tensione costante), dispositivi *impedimetrici* che misurano il rapporto tra tensione e corrente

alternata, e dispositivi potenziometrici che rilevano le variazioni di potenziale a corrente costante.

1.6 Le tecnologie emergenti del biosensing

I biosensori “Lab-on-a-chip” contenenti sistemi fluidici microfabbricati integrati permettono la manipolazione di fluidi che si muovono in piccoli canali. Tali dispositivi possono essere progettati per eseguire saggi biologici o chimici multistep ad alta risoluzione. Molti sono fabbricati usando processi di stampaggio o fotolitografici utilizzando materiali compositi, quarzo, silice o substrati di vetro. La ricerca Lab-on-a-chip è parte di una tendenza nello sviluppo di biosensori verso sistemi ad alta produttività con maggiore integrazione e miniaturizzazione. Gli esempi includono l’amplificazione del DNA in tempo reale per il rilevamento del papillomavirus umano (HPV), la piattaforma microuidica per l’isolamento di cellule specifiche da campioni di sangue, l’isolamento e la purificazione di cellule a bassa abbondanza (circa 1:10.000 cellule) e l’array elettrochimico rilevamento di mutazioni di mismatch a base singola. Gli array entalpici basati sull’analisi della termodinamica delle interazioni molecolari che permettono la rilevazione diretta (Bio-FEVI) sono stati applicati per la rilevazione di una vasta gamma di interazioni biomolecolari, tra cui il legame di DNA e proteine e le reazioni enzimatiche. Il biological compact disk (BioCD), un biosensore interferometrico che usa l’interferometria superficie-normale auto-riferita per rilevare le molecole legate alla superficie di un disco rotante, può permettere un’analisi delle proteine o del DNA ad alta produttività (più di un milione di punti per disco). La tecnologia di scansione dell’array di fibre ottiche (FAST) applica l’ottica della stampa laser per consentire il rilevamento delle cellule rare a velocità fino a 300.000/s, consentendo un aumento di 500 volte rispetto al rilevamento convenzionale con sensibilità comparabile e specificità superiore.

La *nanotecnologia* offre promesse in diverse aree, compresi i trasduttori, i ligandi di riconoscimento, la tecnologia di etichettatura e la produzione. I *nanotrasduttori* offrono nuove capacità potenziali come la miniaturizzazione su scala nanometrica, sensibilità più elevate per la rilevazione di una o poche molecole, costi di produzione ridotti, alta produttività e un gran numero di canali. Ancora più importante, l’uso di effetti quantici, effetti superficie-volume elevati o entrambi forniti dalla nanotecnologia può consentire la creazione di nuovi approcci per il rilevamento del cancro, la diagnostica, il targeting, l’imaging e la somministrazione di farmaci per il cancro. Diverse applicazioni della nanotecnologia sono attualmente in fase di sviluppo per il biosensing ad esempio il Bio-FEVI. Questo include i microcantilever che misurano la flessione dovuta ai cambiamenti della massa superficiale. Include anche i punti

quantici (QD) che sono cristalli semiconduttori di dimensioni nanometriche che assorbono la luce bianca e riemettono la luce in un colore specifico.

I cambiamenti nelle proprietà ottiche dei QD derivano dai cambiamenti sulla loro superficie (per esempio, il legame anticorpo-antigene). I sistemi QD possono essere usati per l'etichettatura biologica e il biosensing. Le nanoparticelle metalliche che mostrano una SPR colloidale (nano-SPR) sono un altro esempio di utilizzo delle proprietà ottiche delle nanoparticelle. I *nanotubi* di carbonio e i *nanofili* non di carbonio cambiano le loro proprietà elettriche superconduttrici, isolanti, semiconduttori o conduttori a causa dei cambiamenti sulla superficie come il legame degli antigeni da anticorpi attaccati.

1.7 Le sfide nel passaggio dei biosensori ai test oncologici point-of-care

Un obiettivo finale per l'applicazione dei biosensori è il test point-of-care (POCT). Come suggerito dall'ampio uso di biosensori per misurare i livelli di zucchero nel sangue, le applicazioni POCT hanno un grande potenziale clinico per i test clinici sul cancro. Ci sono diverse sfide nel passaggio dei biosensori al POCT per il cancro, tra cui:

- La natura dei campioni di cancro (i tessuti del cancro sono spesso eterogenei e contengono sia cellule normali e cellule tumorali).
- La complessità del cancro (molti geni e percorsi sono noti per essere coinvolti nello sviluppo del cancro).
- La grande variabilità genetica del cancro (numerosi mutazioni per ogni gene sono associate al cancro).
- Sviluppo di saggi di biomarcatori riproducibili.
- Necessità di nuovi ligandi di riconoscimento, compresi quelli non anticorpali.
- Sviluppo di biosensori multicanale che permetteranno l'analisi di più analiti associati al cancro.
- Necessità di progressi nella preparazione dei campioni e nell'arricchimento delle cellule tumorali per superare l'eterogeneità del campione e la necessità di analizzare piccoli campioni (in grande parte superata dall'analisi di specifici biomarcatori miRNA).
- Miniaturizzazione e integrazione.
- Sviluppo di nuovi trasduttori più sensibili.
- Integrazione microuidica.
- Necessità di sviluppo di tecniche di fabbricazione avanzate.

- Necessità di riduzione dei costi.

1.8 Conclusioni

Anche se molti biosensori sono stati sviluppati per test relativi al cancro, pochi biosensori sono penetrati nel mercato per diventare ampiamente utilizzati. La complessità del cancro richiede lo sviluppo di strumenti molecolari, sia *genomici* che *proteomici*, per profilare i tumori e produrre “firme molecolari” (basate su firme genetiche ed epigenetiche, cambiamenti nell’espressione genica e nei profili proteici, e modifiche post-traslazionali delle proteine) ha aperto nuove opportunità per utilizzare i biosensori nei test sul cancro.

Sfruttare il potenziale dei biosensori è una sfida a causa della complessità e della diversità del cancro che richiede il dosaggio di più analiti in parallelo. La strategia per lo sviluppo di biosensori, mostrata nella Figura 1-1, include l’utilizzo di biomarcatori del cancro identificati dalle analisi genomiche e proteomiche e dalla ricerca clinica. Il successo dello sviluppo di test sul cancro basati su biosensori richiederà un continuo sviluppo e la convalida dei biomarcatori e lo sviluppo di ligandi per quei biomarcatori, così come il continuo sviluppo di metodi di preparazione del campione e di biosensori multicanale in grado di analizzare molti marcatori del cancro simultaneamente. L’uso di biosensori per i test clinici sul cancro dovrebbe ridurre i tempi di analisi per aumentare flessibilità consentendo analisi multitarget, automazione e riduzione dei costi.

I biosensori hanno il potenziale di fornire test molecolari all’ambiente sanitario della comunità e alle popolazioni scarsamente servite, in tempo reale e a bassi costi.

Capitolo 2

BIO-SENSORI IMPEDIMETRICI LABEL-FREE DETECTION E LABEL-BASED DETECTION: TEORIA BASE ED APPLICAZIONI MEDICHE/GENOMICHE, BIOLOGICHE E IDENTIFICAZIONE DEI MATERIALI ORGANICI/INORGANICI

Un sistema capace di esplicitare una rilevazione robusta, affidabile e quantitativa di biomarcatori a bassissima concentrazione è di grande importanza in ambito clinico. Il biosensore, un dispositivo analitico utilizzato per la rilevazione sensibile e selettiva dei biomarcatori, offre diversi vantaggi rispetto alla diagnosi clinica convenzionale, che richiede tempo e non è adatta ai centri di cura/diagnosi sul posto. Una rivoluzione nella comprensione e nella sintesi dei nanomateriali negli ultimi due decenni ha contribuito significativamente allo sviluppo dei biosensori in termini di sensibilità, attività catalitica, biocompatibilità e robustezza. Inoltre, i nanomateriali aiutano nella miniaturizzazione del sistema di rilevamento e nel successo commerciale dei kit di biosensori portatili. L'ingegneria di caratterizzazione superficiale dei nanomateriali ha analogamente contribuito allo sviluppo del biosensore assicurando una superficie di rilevamento riproducibile e stabile, un'interazione analita-elemento di bio-riconoscimento efficiente e un effetto di anti-fouling marcato in soluzione biologica. Grazie all'integrazione dei nanomateriali e all'ingegneria della caratterizzazione superficiale, i biosensori sono ora ugualmente sensibili ai sofisticati strumenti da laboratorio per rilevare una vasta gamma di molecole di importanza clinica. Di seguito verranno discussi vari tipi di biosensori, i loro progetti e i loro principi di funzionamento.

2.1 OME design base dei biosensori

La rilevazione sensibile a bassa concentrazione di biomolecole o sostanze chimiche è un aspetto importante della diagnosi clinica. In particolare, è fondamentale nel caso di malattie come il cancro, dove la rilevazione precoce può aumentare le possibilità di recupero e di sopravvivenza (Heitzer, et al., 2017). Tuttavia, nelle prime fasi di una malattia, la concentrazione delle biomolecole è molto bassa. Queste biomolecole, chiamate biomarcatori,

confermano l'inizio di una malattia e la loro concentrazione ne riflette lo stadio della progressione. I metodi convenzionali per l'individuazione dei biomarcatori includono strumenti sofisticati di fascia alta e strumenti di laboratorio che richiedono uno spazio dedicato, risorse umane qualificate e una quantità significativa di tempo.

Le attuali tecniche come la microscopia, la coltura cellulare, la proteomica o le tecniche di rilevamento basate sulla biologia molecolare sono in grado di rilevare l'analita anche se alle volte pur confidando sulla loro sensibilità, richiedono diversi giorni per dare dei risultati. Tutte queste tecniche e strumenti sono molto spesso grandi per essere trasportati in luoghi remoti e inaffidabili per il rilevamento in condizioni di emergenza. Ci sono però degli strumenti con particolari requisiti e metodi di rilevamento, che possono essere usati per una misura rapida e sensibile e che possono essere trasportati facilmente. I biosensori, un dispositivo bio-analitico in grado di rilevare una quantità ultraridotta di biomarcatori con nanomateriali supportati *dall'ingegneria di caratterizzazione superficiale*, possono essere utilizzati per questo scopo. Un esempio di dispositivo bio-analitico di bio-sensing multi spettrale è rappresentato dal Bio-FEVI. L'Unione internazionale di chimica pura e applicata definisce un biosensore come: *“Un dispositivo che utilizza reazioni biochimiche specifiche mediate da enzimi isolati, sistemi immunitari, tessuti, organelli o cellule intere per rilevare composti chimici di solito tramite segnali elettrici, termici o ottici”*. I biosensori sono essenzialmente costituiti da tre unità un elemento di bio-riconoscimento (E-BR), un operazionale di transimpedenza e un amplificatore operazionale diversamente connesso più una logica di conversione, elaborazione dati e unità di processo. Queste ultime tre unità sono di corredo al biosensore meglio definito **trasduttore** in quanto il biosensore è essenzialmente costituito dalla parte di bio-riconoscimento o anche detto elettrodo bio-attivo di rilevamento che contiene il ligando che esplica la reazione chimica, il trasduttore che converte l'evento di bio-riconoscimento in un segnale misurabile. Questo viene ulteriormente acquisito, convertito nuovamente ed il segnale di uscita elaborato da un processore per essere rappresentato in un formato comprensibile dall'operatore. Un diagramma schematico dei costituenti fondamentali e della classificazione dei biosensori è mostrato in Figura 2.1. I biosensori sono dispositivi analitici che vengono utilizzati non solo per rilevare la presenza e la quantità di un analita, ma anche per studiare diversi altri fenomeni come la fisiologia cellulare, la meccanica cellulare, l'effetto delle molecole di farmaci sulle cellule. Quindi, i biosensori sono progettati secondo l'obiettivo e il meccanismo di trasduzione per ottenere un segnale misurabile ad alta risoluzione per distinguere la più piccola variazione in concentrazione dell'analita target. Inoltre, i biosensori dovrebbero essere in grado di distinguere il bersaglio dalle molecole non specifiche nella soluzione di rilevamento. Le

prestazioni analitiche dei biosensori vengono misurate in termini di sensibilità, selettività, limite di rilevazione, campo di rilevamento, capacità di riutilizzo.

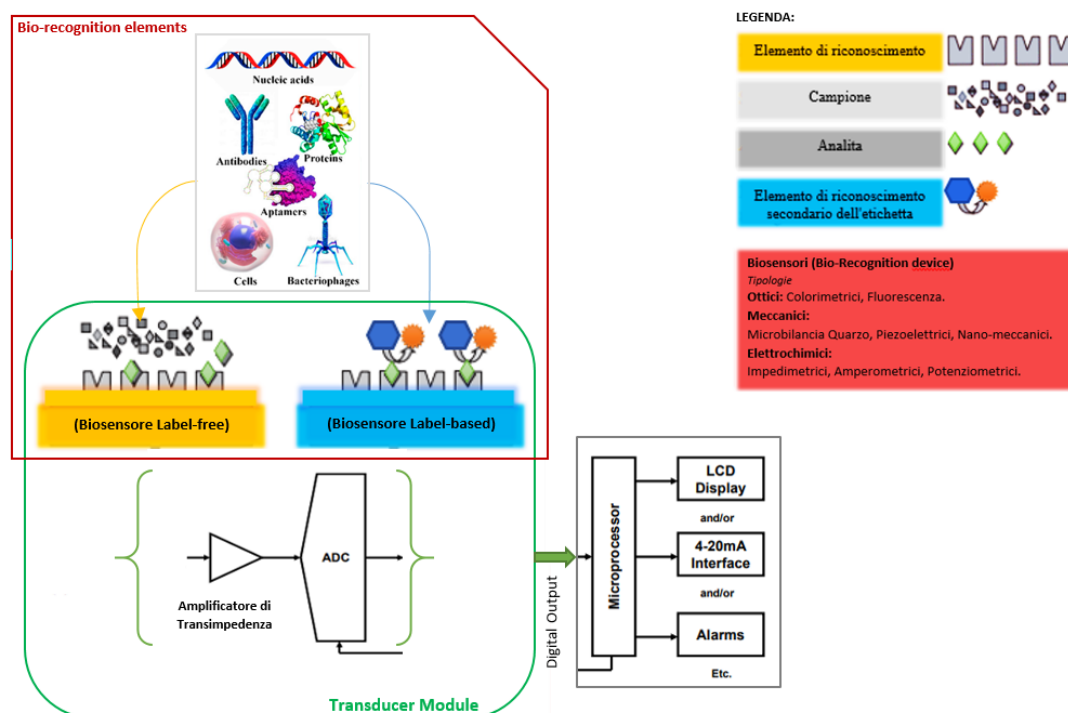


Figura 2-1: Design di base dei biosensori con i tre componenti più importanti, cioè B-RE, trasduttore e processore. In base al meccanismo di trasduzione, i biosensori sono classificati in biosensori ottici, meccanici ed elettrochimici.

Tuttavia, i biosensori sono inclini a ostacolare la generazione del segnale a causa dell'effetto della matrice di rilevamento e delle molecole coesistenti. Nanomateriali di diverse dimensioni, forma e proprietà, come nanomateriali metallici, polimeri, nanomateriali di carbonio, punti quantici, ecc. sono stati utilizzati per migliorare l'efficienza dei biosensori e ridurre l'interferenza dalla matrice di rilevamento. L'integrazione dei nanomateriali porta al concetto di diagnosi point-of-care, un kit diagnostico portatile per il rilevamento in loco robusto e sensibile delle molecole clinicamente importanti. I nano-materiali sono diventati parte integrante della progettazione di biosensori per ottenere una maggiore sensibilità e l'amplificazione del segnale sfruttando la sua maggiore area superficiale, la proprietà optoelettronica dipendente dalle dimensioni, la conducibilità elettrica, l'alta attività catalitica o talvolta l'inerzia del materiale, come (nanoparticelle) e la biocompatibilità. Una superficie modificata di nanomateriali può adsorbire più sostanze nella sua superficie e può anche rilevare più analiti di una superficie non modificata. I nanomateriali hanno aiutato nella miniaturizzazione del dispositivo di rilevamento sviluppando la piattaforma su scala nanometrica, che è portatile e può raggiungere la stessa sensibilità degli strumenti sofisticati.

Per ottenere la selettività, gli E-BR sono coniugati sulla superficie del sensore modificato dai nanomateriali introducendo tecniche di immobilizzazione adeguate. Le strategie di funzionalizzazione aiutano anche ad aumentare la gamma di rilevamento dei biosensori aumentando il carico degli E-BR sui nanomateriali. Queste strategie possono essere interazioni covalenti o non covalenti. Le interazioni non covalenti non distruggono gli scheletri coniugati e riducono la perdita di proprietà elettroniche delle nanoparticelle (NPs). Tuttavia, le interazioni covalenti sono preferite per la loro stabilità e riproducibilità della superficie di coniugazione. Sia i nanomateriali e la chimica di superficie sono necessari per il rilevamento di concentrazione ultra-bassa dell'analita e la sua stabilità nei campioni biologici. Nei prossimi paragrafi verrà discussa nel dettaglio la progettazione dei biosensori con approfondimenti sugli usi dei nanomateriali e dell'ingegneria di superficie per migliorarne l'efficienza. Inoltre verranno discussi anche diversi tipi di biosensori, le loro prestazioni analitiche e le strategie di amplificazione del segnale. Negli ultimi anni, diverse nuove tecnologie sono state incorporate nei biosensori per migliorarne le prestazioni.

2.2 Eterogeneità dei biosensori

I biosensori sono progettati in base all'analita target e al meccanismo di trasduzione. In base all'uso delle etichette, i biosensori possono essere classificati in biosensori con e senza etichetta anche chiamati Label-free o Label-Based mostrati in figura 2.1 (Li, et al., 2011), (Xiong, et al., 2017). I biosensori etichettati utilizzano un reporter o un'etichetta per rilevare l'analita, come gli enzimi, composti elettro attivi o molecole fluorescenti. Sebbene l'etichetta aiuti nell'amplificazione del segnale e nell'aumento della selettività per il rilevamento, essa determina un incremento del costo totale e del tempo di rilevamento. D'altra parte, le tecniche senza etichetta si basano sul riconoscimento del bersaglio da parte degli E-BR, e il suo design semplice favorisce lo sviluppo di dispositivi portatili.

I biosensori sono sviluppati su una matrice di supporto (matrice del sensore), che è funzionalizzata per attaccare gli E-BR per la rilevazione sensibile di un analita. La natura del materiale, il tipo di fabbricazione e il design della matrice del biosensore influenzano notevolmente la capacità di rilevamento finale quindi sulla base di questi elementi i biosensori verranno scelti accuratamente in funzione all'analita e al meccanismo di trasduzione prescelto.

Materiali come carta, grafite, pasta di carbonio, elettrodo di carbonio vetroso (GCE), elettrodi serigrafati (SPE) e ossido di indio e stagno (ITO) sono alcune delle matrici di sensori più utilizzati.

La carta è una matrice a basso costo utilizzata per lo sviluppo di piattaforme di rilevamento ottico, elettrochimico e microfluidico grazie alla sua porosità e alla presenza di un'azione capillare intrinseca che facilita l'autopompaggio dei fluidi del campione. La scelta di una buona qualità di carta, basata sulla composizione e la porosità è importante per ottenere una desiderata sensibilità e stabilità.

Una grande parte dei biosensori in commercio è sviluppata su bastoncini di carta impiegati per l'analisi a flusso laterale (LFA). Gli elettrodi di metalli nobili (platino, oro, argento) sono noti per la loro eccellente cinetica di trasferimento degli elettroni. Tra questi, l'elettrodo di Au è il più utilizzato per la sua stabilità e inerzia con un range di lavoro da -0,1 a 1,3V. Tra i vari elettrodi ceramici, lo ITO è il più comunemente usato per la sua eccellente conducibilità elettrica, ampio range di lavoro (da -0,4 a 1,9V), eccellente capacità di adesione al substrato, bassa corrente capacitiva, caratteristiche elettrochimiche e fisiche stabili e trasparenza ottica.

L'ossido di indio e stagno è stato progressivamente impiegato nei biosensori usando tecniche per la salinizzazione, la deposizione elettroforetica ed elettrochimica, la polimerizzazione e la modificazione basata sull'adsorbimento per ancorare le biomolecole. Tuttavia, l'ossido di indio e stagno è instabile in ambienti acidi e la sua cinetica di trasferimento degli elettroni è inferiore a quella del GCE ed elettrodi di metalli nobili. L'elettrodo di carbonio vetroso presenta un basso tasso di ossidazione, inerzia chimica e un'ampia gamma di potenziale necessaria per un efficace biosensing. L'elettrodo di carbonio vetroso puro può catalizzare efficacemente alcune reazioni di rilevamento senza alcuna rilevante nano-fabbricazione nella concentrazione di analiti, anche se il GCE è in gran parte noto come chimicamente inerte. I siti di bordo e i difetti presenti sulla superficie dell'elettrodo GCE rappresentano i centri di catalisi.

Gli elettrodi serigrafati sono elettrodi monouso sviluppati stampando vari tipi di inchiostri (ad esempio carbonio, argento e oro) su diversi substrati di ceramica o plastica, con forma, e modelli differenti. Il vantaggio principale di lavorare con gli SPE è la portabilità, il basso costo, la facilità di funzionalizzazione e la possibilità di integrare tutti gli elettrodi (di riferimento, di lavoro e ausiliari) in un unico setup elettrochimico.

Le piattaforme/matrici dei sensori devono essere scelte con attenzione, poiché ogni matrice ha il suo modello caratteristico e si comporta diversamente dagli altri.

2.3 Elementi di bioriconoscimento (E-BRs)

Gli E-BR vengono immobilizzati principalmente sulla superficie del trasduttore per interagire selettivamente con le molecole dell'analit., Dove avviene il bioriconoscimento l'evento è quantizzato per ulteriori applicazioni di rilevamento. Gli E-BR possono essere classificati in elementi di riconoscimento biocatalitico come gli enzimi; e bioelemento di riconoscimento della complessità/bioaffinità come un anticorpo, sequenza acido nucleico, aptamero. In alternativa, la superficie di un nanomateriale modificato viene sfruttata per il suo comportamento catalitico, al fine di rilevare gli analiti, anche se manca la selettività delle E-BR. Gli E-BR più selettivi o sensibili non sono sempre utilizzati nel biosensore, ma un attento equilibrio tra sensibilità, selettività, riproducibilità, riusabilità, parametri fisici e facilità di fabbricazione, ecc. viene mantenuta. Una mappa decisionale sistematica può essere usata per la selezione degli E-BR durante la progettazione di un biosensore (come mostrato in Fig. 2.2).

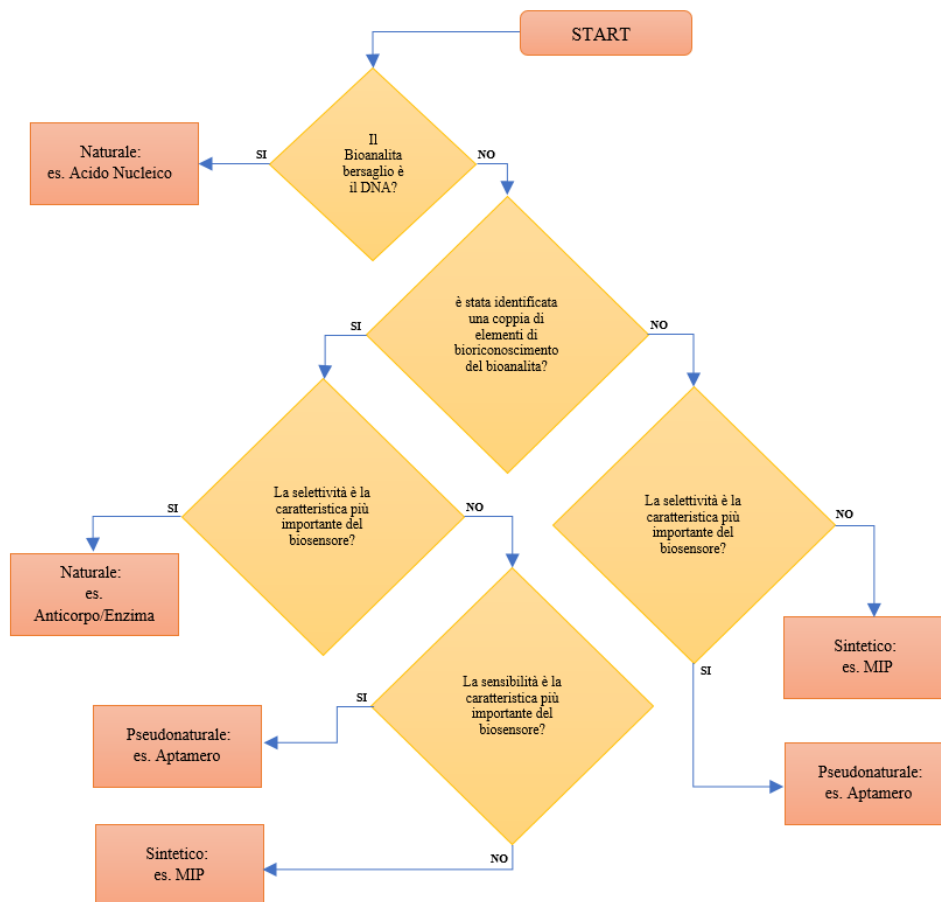


Figura 2-2: La mappa decisionale degli elementi di bioriconoscimento che può essere utilizzata per selezionare gli E-BR giusti nella progettazione iniziale dei biosensori.

2.3.1 Enzima

Gli enzimi, noti anche come biocatalizzatori, sono noti per la loro specificità verso il substrato, che può essere spiegata da un modello di blocco e chiave o modello di fit indotto. I biosensori enzimatici sono di natura biocatalitica cioè convertono l'analita in un prodotto, che può essere misurato dal cambiamento di colore, carica o capacità. Gli enzimi sono collocati vicino alla superficie del trasduttore o incorporati in nanomateriali conduttori per un percorso di diffusione più veloce e breve per una migliore generazione del segnale. Glucosio ossidasi è l'enzima più comunemente usato nella progettazione di biosensori per rilevamento del glucosio. Perossidasi di rafano (HRP), un altro enzima, comunemente coniugato con anticorpi secondari per migliorare il segnale.

2.3.2 Anticorpo

L'anticorpo, un altro E-BR a base proteica, ha un unico modello di riconoscimento 3D sul suo braccio F_{ab} per riconoscere un particolare analita formando un immunocomplesso antigene-anticorpo (Fig. 2.3). L'immunocomplesso anticorpo-antigene può essere monitorato da un sensore piezoelettrico, ottico o elettrochimico. Anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali e anticorpi ricombinanti sono usati nei biosensori, dove l'orientamento corretto può aumentare la sensibilità del biosensore di molte volte (Lipman, et al., 2005).

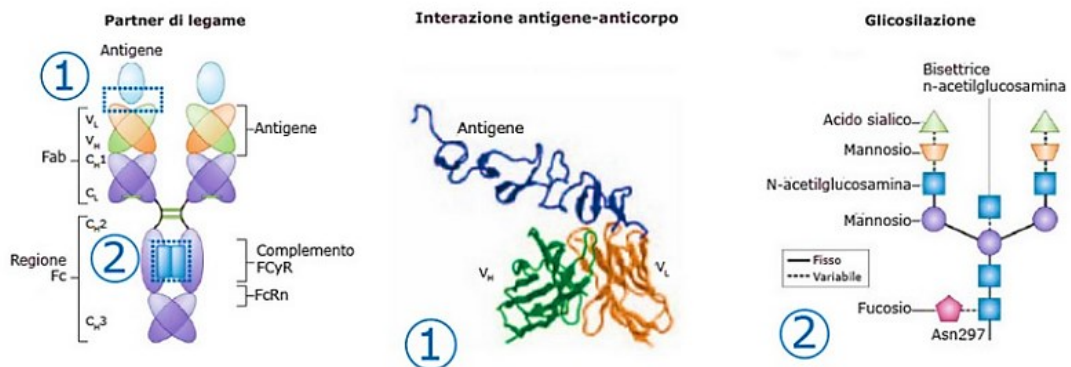


Figura 2-3: Struttura molecolare di un anticorpo monoclonale

Ogni anticorpo monoclonale presenta profilo unico, in relazione a:

- regione di legame con l'antigene (1)
- funzione effettrice citotossica dell'Fc (2)
- legame ai recettori dell'Fc

Questa tecnologia è particolarmente vantaggiosa dal punto di vista produttivo, perché ogni ibridoma può produrre grandi quantità di anticorpi identici completamente umani, può essere

coltivato indefinitamente e selezionato per identificare anticorpi con la specificità, l'affinità e l'attività mirata desiderate (Carter, et al., 2006), (Zola, et al., 2013).

2.3.3 *Aptamero*

L'aptamero, un oligonucleotide sintetico progettato tramite Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) può essere sviluppato per riconoscere selettivamente diversi analiti come ioni, proteine, molecole di farmaci o cellule. Gli aptameri sono molto selettivi e insensibili ai cambiamenti di pH, temperatura e forza ionica, per cui sono preferiti nei biosensori rispetto agli anticorpi.

2.3.4 *Biosensori ad acido nucleico*

I biosensori ad acido nucleico contengono una sequenza complementare sonda stem-loop (SLP) o sonda lineare (LP), nella superficie di rilevamento della sequenza dell'analita target. I genosensori raggiungono la sensibilità grazie alla regola di accoppiamento delle basi, e anche un singolo mismatch può essere rilevato efficacemente per studiare le mutazioni. Recentemente, gli acidi nucleici bloccati (LNA) e gli acidi nucleici peptidici (PNA) sono utilizzati nei genosensori.

2.3.5 *Cellule e tessuti*

Le cellule e i tessuti sono utilizzati nei biosensori per il rilevamento di diversi analiti e per monitorare la fisiologia e la meccanica delle cellule. Recentemente, i batteriofagi e il **phage display** (tecnica di modifica genomica) basato sulle proteine viene utilizzato per identificare gli analiti basati sulle interazioni proteina-proteina. I recettori proteici non catalitici transmembrana o solubili si legano selettivamente a molecole specifiche con affinità e specificità molto elevate sono anche usati come E-BR.

2.3.6 *Polimeri a impronta molecolare (MIP)*

I polimeri a impronta molecolare (MIP) sono polimeri sintetici con un sito di legame selettivo per il bersaglio. I MIP sono sintetizzati utilizzando un modello molecolare che crea una cavità per catturare l'analita. Tuttavia, attualmente, i MIP vengono sviluppati solo per piccole molecole.

2.4 Trasduttore

Il trasduttore converte l'evento di bioriconoscimento in un segnale misurabile. In base al trasduttore, i biosensori possono essere classificati in biosensori ottici, meccanici o elettrochimici.

2.4.1 Biosensori ottici

I biosensori ottici monitorano i cambiamenti di fase, polarizzazione o frequenza nel campo ottico di un elemento di bioriconoscimento su interazione con l'analita. In base al meccanismo di trasduzione utilizzato, un biosensore ottico può essere classificato in assorbimento, fluorescenza. I biosensori basati sull'assorbimento rilevano il cambiamento di ampiezza della luce quando cade sulla superficie di rilevamento vuota a quando cade in presenza di analiti. Questo cambiamento di ampiezza può essere correlato per quantificare la concentrazione dell'analita in una soluzione. Quando si opera nello spettro visibile della luce, questo tipo di biosensori è colorimetrico. I biosensori colorimetrici (di solito etichettati) sono generalmente preferiti quando non è richiesto alcuno strumento per il rilevamento dell'analita. La concentrazione dell'analita può essere quantificata utilizzando la legge di Beer-Lambert come mostrato nell'equazione (1)

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon C \Delta x \quad (1)$$

dove I è l'intensità dell'onda elettromagnetica riflessa; I_0 è l'intensità dell'onda elettromagnetica incidente; ε è il coefficiente di estinzione molare del mezzo; C è la concentrazione dell'analita, e Δx è la variazione della lunghezza del percorso.

Può essere sviluppato un biosensore ottico colorimetrico a occhio nudo in cui la concentrazione dell'analita ALP ad esempio nei campioni di latte viene rilevata utilizzando il comportamento enzimatico dell'ALP per catalizzare un reagente colorato e cambiare il colore della soluzione del campione. La rilevazione può avvenire mediante semplice telecamera per studiare il cambiamento di colore con riferimenti al cambiamento della concentrazione di ALP nella soluzione. Un esempio di comportamento enzimatico è mostrato nella Figura 2.4 e 2.5.

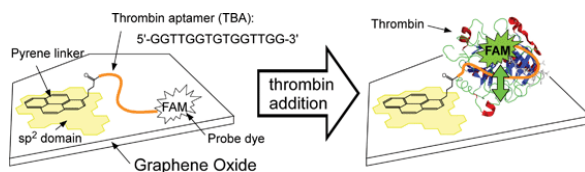


Figura 2-4: Rilevamento della trombina basato sulla fluorescenza

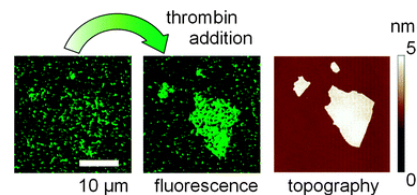


Figura 2-5: Superficie di rilevamento

I biosensori basati sulla fluorescenza sono attualmente sviluppati per realizzare il rilevamento di una singola molecola o dell'analita in un campione. Oltre alla fluorescenza, il trasferimento di energia di risonanza della fluorescenza (FRET) e il recupero della fluorescenza dopo la degradazione fotochimica del fluoruro utilizzati nei biosensori sono basati sul diagramma energetico di Jablonski, dove la luce incidente che fluoresce allo stato di bassa energia è indipendente dai massimi di assorbimento.

"...Le transizioni radiative comportano l'assorbimento di un fotone, se la transizione avviene a un livello di energia superiore, o l'emissione di un fotone, per una transizione a un livello inferiore. Le transizioni non radiative sorgono attraverso diversi meccanismi, tutti etichettati in modo diverso nel diagramma. Il rilassamento dello stato eccitato al suo livello vibrazionale più basso è chiamato rilassamento vibrazionale. Questo processo comporta la dissipazione di energia dalla molecola all'ambiente circostante e quindi non può verificarsi per molecole isolate. Un secondo tipo di transizione non radiativa è la conversione interna (IC), che si verifica quando uno stato vibrazionale di uno stato eccitato elettronicamente può accoppiarsi a uno stato vibrazionale di uno stato elettronico inferiore. Un terzo tipo è l'intersystem crossing (ISC); questa è una transizione verso uno stato con una molteplicità di spin diversa. Nelle molecole con un grande accoppiamento spin-orbita, l'incrocio intersistemico è molto più importante che nelle molecole che mostrano solo un piccolo accoppiamento spin-orbita. L'ISC può essere seguito da fosforescenza." (Jabłoński, 1933)

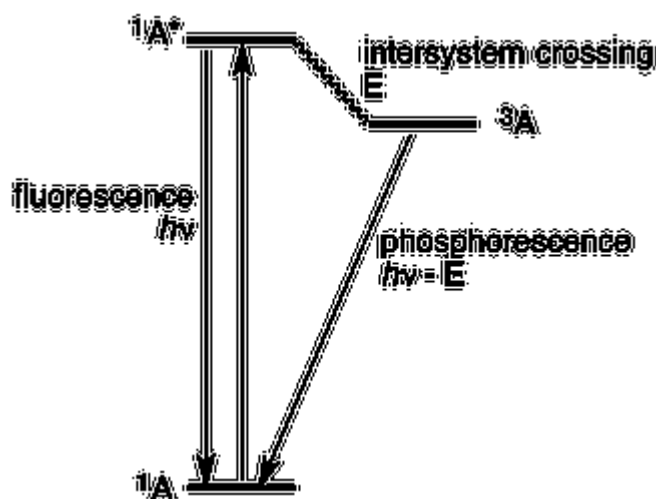


Figura 2-6: diagramma di Jablonski che mostra l'eccitazione della molecola A al suo stato eccitato di singoletto ($1A^*$) seguito da un passaggio intersistemico allo stato di tripletta ($3A$) che si rilassa allo stato fondamentale per fosforescenza.

2.4.2 Biosensore medicale

Nei biosensori meccanici, i cambiamenti nei parametri mecano-fisici come forze, movimento, masse, ecc. sono quantificati dopo l'interazione biomolecolare. I biosensori meccanici offrono alcuni vantaggi rispetto ad altri biosensori. Questi dispositivi sono capaci di una squisita risoluzione di massa, che può essere usata per sviluppare biosensori basati sulla bioaffinità per rilevare la più piccola quantità di analita (ad esempio, i sistemi nano-elettromeccanici (NEMS) hanno raggiunto una risoluzione di massa su scala di zepto-grammi). In secondo luogo, questi dispositivi subiscono uno spostamento misurabile contro una forza applicata (convertibile in un segnale elettrico), che può essere usato per la quantificazione delle forze a livello cellulare. Hanno un tempo di rilevamento molto veloce, necessario per studiare gli eventi biologici. Inoltre possono rilevare un analita in entrambi i liquidi, e nelle fasi gassose. Non c'è necessità di etichettatura in questi dispositivi, che è un requisito essenziale nel rilevamento ottico.

I biosensori meccanici possono essere categorizzati in tre classi principali: cioè microbilancia al quarzo, onde acustiche di superficie e sistemi nano-meccanici. I biosensori meccanici consistono in una sonda a cantilever, un trasduttore meccanico e un processore. La sonda a cantilever è modificata per rilevare l'analita, dove le sue prestazioni, come la capacità di adsorbimento delle proteine o il limite di rilevamento sono una funzione della sua forma/dimensione e proporzionali alla massa del cantilever. Una antilever dimensionato su micro o nano scala è preferita per ottenere un migliore LOD (Limit of Detection). Dopo l'interazione con la molecola dell'analita, le proprietà meccaniche del cantilever cambiano in proporzione al cambiamento di massa, che può essere quantificato dalla deflessione (statica) e risonanza (dinamica) che assume il cantilever nella fase di distacco con l'analita.

In modalità statica, il cambiamento di curvatura del cantilever è misurato come risultato del cambiamento di massa dovuto all'interazione ligando-analita. La modalità statica, ha bisogno di un elettrodo di riferimento, e la flessione del cantilever come risultato dell'adsorbimento biomolecolare può essere spiegata matematicamente dal modello di Stoney come mostrato nell'equazione (2):

$$\Delta \sigma_1 - \Delta \sigma_2 = \frac{E t^2}{3(1-\nu)L^2} \cdot \Delta z \quad (2)$$

Dove, $(\Delta \sigma_1 - \Delta \sigma_2)$ è la variazione della sollecitazione superficiale tra il lato superiore e il lato inferiore; Δz è lo spostamento del cantilever; E è il modulo di Young; ν è il coefficiente di Poisson; L e t sono rispettivamente la lunghezza e lo spessore del cantilever.

In modalità dinamica (chiamata anche modalità risonante), il cantilever agisce come una microbilancia, dove misura i cambiamenti nella frequenza di risonanza causata dal cambiamento di massa agente. Inoltre, diversi modi di risonanza come il modo trasversale, il modo torsionale, il modo laterale e il modo longitudinale sono usati nel rilevamento dinamico. Una massa aggiunta sul cantilever diminuisce la sua frequenza di oscillazione, che può essere misurata dall'equazione (3):

$$\Delta m = \frac{1}{0,96\pi^2} \left(\frac{1}{f_0^2} - \frac{1}{f_1^2} \right) \quad (3)$$

dove f_0 e f_1 sono la frequenza di risonanza fondamentale prima e dopo l'aggiunta della massa (m), rispettivamente.

I trasduttori meccanici sono raggruppati in due categorie, cioè basati sulla variazione di spostamento o sulla piezoelettricità. Il trasduttore basato sullo spostamento utilizza un rilevatore ottico che monitora un laser riflesso dalla superficie del cantilever, che cambia la sua posizione in funzione della massa alterata su di essa. Il trasduttore con un cristallo piezoelettrico genera piezoelettricità a fronte di uno stimolo, che viene registrato per il biosensing. La massa, la sollecitazione superficiale, il modulo di Young e la viscoelasticità del sistema di sensori cambiano come risultato dell'adsorbimento dell'analita, che viene monitorato dal biosensore.

2.4.3 Biosensori elettrochimici

Un biosensore elettrochimico (CE) è definito come “un dispositivo integrato autonomo, capace di fornire informazioni analitiche quantitative o semi-quantitative specifiche”. I biosensori elettrochimici si basano sulla misurazione dei cambiamenti di corrente, potenziale, conduttanza o effetto di campo dovuti all'interazione della molecola bersaglio con gli E-BR sulla superficie di rilevamento. I biosensori elettrochimici sono preferiti per la loro robustezza, selettività, sensibilità, prestazioni analitiche rispetto ad altri biosensori. I biosensori elettrochimici si basano sul sistema a tre elettrodi (avvolte anche quattro), ovvero elettrodo di lavoro (ad esempio WCE, che funge da elemento trasduttore), elettrodo ausiliario/controelettrodo (ad esempio elettrodo Pt, che agisce per completare il circuito), e un elettrodo di riferimento (ad esempio l'elettrodo Ag/AgCl, usato per stabilire un potenziale noto). La scelta del giusto elettrodo di lavoro è uno dei compiti più importanti nella progettazione di un biosensore elettrochimici, in quanto la modifica dei nanomateriali e

l'ingegneria della superficie viene effettuata sull'elettrodo di lavoro. Il principio fondamentale dietro il funzionamento del biosensore elettrochimico risiede nella cinetica di trasferimento di ioni/elettroni dal centro di reazione alla superficie dell'elettrodo. Sia nei biosensori elettrochimici senza etichetta che in quelli con etichetta, si misura l'aumento o la diminuzione del trasferimento di elettroni. Nei biosensori basati su E-BR catalitici, come gli enzimi, i biocatalizzatori attivano un evento che aumenta il trasferimento di elettroni alla superficie dell'elettrodo. In base al trasduttore utilizzato, i biosensori elettrochimici sono categorizzati in amperometrici/voltmetrici, potenziometrici, impedimetrici/conduktometrici.

Amperometrici/voltmetrici - Nei sensori biologici voltammetrici/amperometrici, un potenziale variabile/statico viene applicato a un elettrodo di lavoro contro un elettrodo di riferimento e la corrente risultante viene misurata. Il potenziale applicato avvia una reazione elettrochimica di ossidazione o riduzione (redox) negli elettroliti presenti nella soluzione. Questa reazione redox avviene sulla superficie dell'elettrodo di lavoro e genera elettroni a un potenziale specifico basato sulla natura dell'elettrolita. Questa risposta in corrente si traduce in un picco proporzionale alla concentrazione della soluzione e alla velocità di trasporto di massa delle molecole reagenti dalla soluzione bulk all'elettrodo in modalità passo, passo. Le diverse combinazioni di parametri, compreso il potenziale (E), corrente (I), carica (Q) e tempo (t), vengono usati per sviluppare diverse tecniche per gli studi elettrochimici, come la Voltammetria ciclica (CV), cronoamperometria (CA), cronocoulometria (CC), cronopotenziometria (CP), voltammetria differenziale a impulsi (DPV), voltammetria a onda quadra (SWV), tecniche di stripping anodico, ecc. Tra queste tecniche, la CV e LSV sono utilizzate per l'analisi primaria per determinare il comportamento del potenziale redox elettrochimico dell'analita, mentre DPV/SWV è usato per il rilevamento sensibile di un analita.

Potenziometrici - I biosensori potenziometrici misurano il potenziale di una cella elettrochimica all'elettrodo di lavoro quando non scorre corrente nella cella CE. La potenziometria fornisce informazioni sulle attività redox all'interno delle cellule CE. Gli E-BR come gli enzimi sono solitamente integrati in sensori potenziometrici, dove gli ioni generati cataliticamente sono rilevati dagli elettrodi. La relazione tra il potenziale e la concentrazione dell'analita è governata dall'equazione di Nernst come segue:

$$E_{cell} = E_{cell}^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (4)$$

dove E_{cell} è il potenziale della cella elettrochimica in corrente zero; E_{cell}^0 è il potenziale costante della cella elettrochimica; R è la costante del gas reale; T è la temperatura assoluta; n è il numero degli elettroni di trasferimento; F è la costante di Faraday, e Q è il rapporto delle concentrazioni di ioni allo stato ridotto e allo stato ossidato.

Impedometrici/conduktometrici - I biosensori per conduttometria misurano i cambiamenti nella conduttività elettrica di una soluzione campione la quale cambia composizione durante una reazione chimica. Nei biosensori impedimetrici, l'impedenza viene misurata attraverso l'elettrodo di lavoro e il controelettrodo rispetto all'elettrodo di riferimento.

I sensori di impedenza sono più comunemente usati per la rilevazione senza etichetta, in quanto questo metodo non richiede alcuna etichetta di rilevamento degli analiti. L'attaccamento degli analiti sulla superficie modificata dai nanomateriali aumenta il trasferimento di elettroni dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo aumentando l'impedenza del sistema, che può essere calibrata prendendo concentrazioni note dell'analita. Matematicamente l'impedenza può essere espressa nel seguente modo:

$$Z(j\omega) = \frac{U(j\omega)}{I(j\omega)} \dots, \omega = 2\pi f \quad (4)$$

dove Z è l'impedenza; U è il potenziale; I è il flusso di corrente attraverso il circuito, ω è la frequenza angolare del potenziale sinusoidale e f è la frequenza. Nel complesso, i biosensori elettrochimici offrono un rilevamento robusto e sensibile degli analiti con l'opzione di miniaturizzazione del dispositivo e/o integrazione in altri devices, vedi Figura 2.7 (a, A).

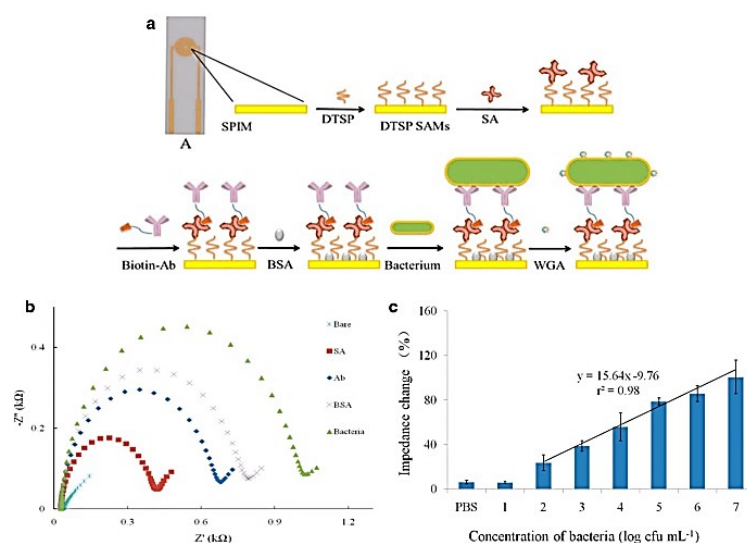


Figura 2-7: Classe di elettrodo SPM label-free - Rappresentazione schematica della modifica superficiale elettrodo spm con inserimento dei nano bsa per aumentare la capacità selettiva del sensore e conseguente aumento dei valori Rct e concentrazione di proteine leganti di specie identificate.

La figura 2.7 mostra la rilevazione senza etichetta di un batterio in campione di siero, dove un aumento della concentrazione dell'analita porta a un aumento del valore dell'impedenza misurato in Resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}), unità Ohm. L'aumento dell'immobilizzazione dei batteri sull'Au-DTSP/SA può ostacolare il trasferimento di carica dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo AU/SPM. Questo sensore può essere utilizzato con successo per rilevare la concentrazione di batteri con risultati paragonabili ai metodi clinici.

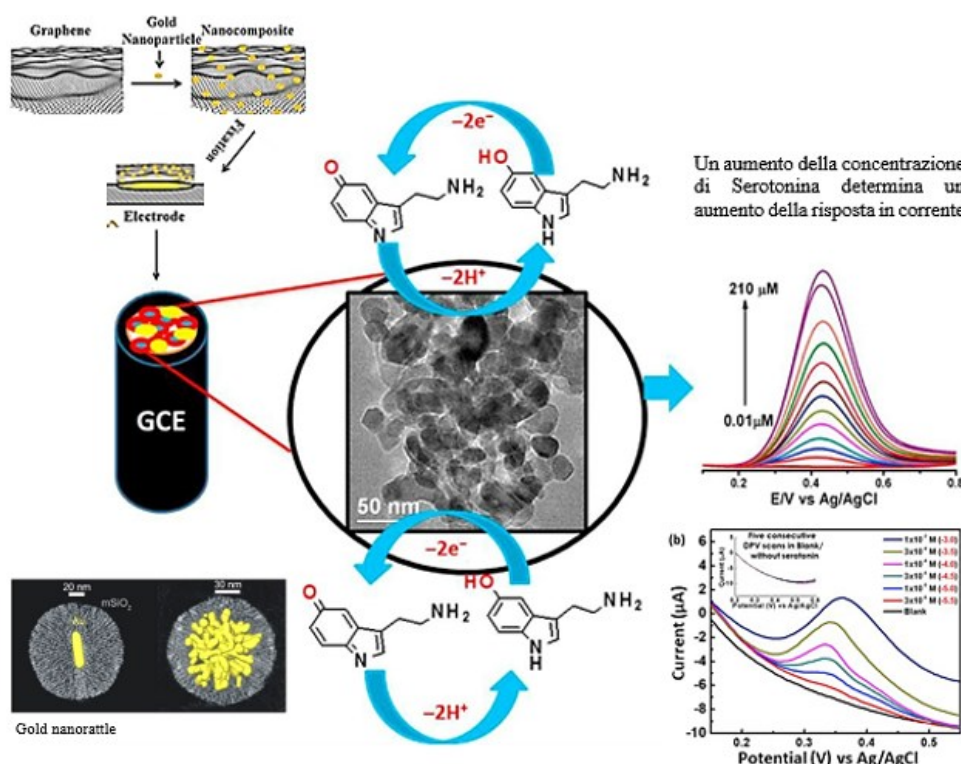


Figura 2-8: Classe di elettrodo GCE label-free – mostra il principio di rilevamento e la modifica della superficie su GCE per il rilevamento della serotonina.

La Figura 2.8 mostra il principio del rilevamento della serotonina da un elettrodo GCE modificato con nano rattle di Au. L'ossidazione catalizzata sull'elettrodo della serotonina, rilascia elettroni nel sistema dando una risposta in corrente funzionalmente alla sua concentrazione. Tale approccio di rilevamento può essere adattato in base alla natura dell'analita, del nanomateriale e del trasduttore elettrochimico.

2.5 Nanomateriali a supporto della ingegneria di superficie

I nanomateriali per le applicazioni nella ingegneria di superficie hanno dimensioni caratteristiche che variano nell'intervallo di 1÷100 nm (vedi figura 2.9);

Sono usati in molte aree di ricerca, come la somministrazione di farmaci, terapeutica, la terapia foto-termica, così come il biosensing;

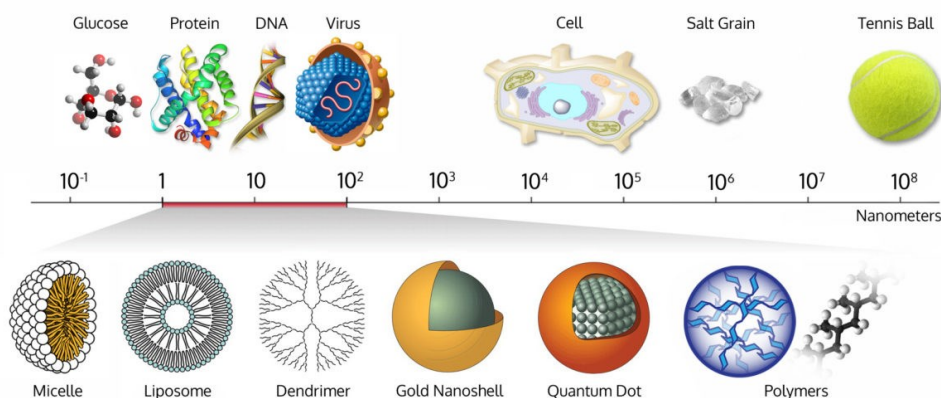


Figura 2-9: Scala di confronto delle bio-nanoparticelle.

Possiedono un rapporto superficie/volume più elevato, che viene utilizzato nella progettazione di biosensori per rendere la superficie del sensore più conduttiva, capace di un maggiore attaccamento degli E-BR, e ridurre gli effetti di fouling.

I nanomateriali sono utilizzati nella fabbricazione di biosensori per ottenere un rapido movimento di ioni tra l'elettrodo e il bersaglio, una migliore attività catalitica, diffusione rapida dell'analita, preconcentrazione delle molecole di analita vicino alla superficie dell'elettrodo ed effetto anti-fouling. Le diverse dimensioni, proprietà, forme e strutture sono utilizzate per raggiungere diversi obiettivi nei biosensori, dove gli E-BR sono coniugati funzionalizzando i nanomateriali per sviluppare biosensori basati sulla bio-affinità o biocatalitici. Le nanoparticelle metalliche sono utilizzate per le loro proprietà ottiche, elettromagnetiche e chimiche dipendenti dalle dimensioni, in particolare nanoparticelle d'oro (AuNP) sono più utilizzate per applicazioni di bio-rilevamento grazie all'inerzia chimica del metallo nobile, la biocompatibilità, le proprietà ottiche ed elettroniche uniche e dipendenti dalle dimensioni, e la facilità di sintesi e funzionalizzazione. Le AuNP sono utilizzate in combinazione con altri nanomateriali o coniugate con anticorpo/aptametro per sviluppare biosensori basati sulla bioaffinità. Le nanoparticelle di ossido di metallo (MONP), specialmente di metalli del blocco periodico *d* ed *f* come Zn, Ce, Mn e Fe sono utilizzati per la loro attività catalitica, capacità di adsorbimento, biocompatibilità, ecc.

Tuttavia, i nanomateriali con due o più elementi vengono sviluppati principalmente per il loro comportamento catalitico superiore rispetto alle loro controparti monometalliche. Oltre alle nanoparticelle metalliche, i nanomateriali a base di carbonio sono i più comunemente usati

in applicazioni di biosensing grazie alla loro peculiarità. I nanomateriali a base di carbonio come quelli monodimensionali (CNT, MWCNT, SWCNT), bidimensionali (GO), tridimensionale (fullerene) vengono utilizzati per lo sviluppo di biosensori ottici ed elettrochimici. Tra questi, il grafene è considerato il materiale delle meraviglie e i suoi derivativi come l'ossido di grafene e l'ossido di grafene ridotto utilizzati nei biosensori. Un'altra classe di nanomateriali, i nanocristalli luminescenti, nanocristalli semiconduttori, i quantum Dots (QD), sono usati in biosensori ottici così come nei biosensori elettrochimici per il comportamento foto-elettrochimico (PEC).

I polimeri sono un altro tipo di nanomateriale a basso costo, flessibile e biocompatibile usato in applicazioni di biosensing grazie al suo eccellente potenziale di funzionalizzazione e bassa tossicità. I polimeri conduttori, come il poli-acetilene, il poli-3,4-etilendioossitofene (PEDOT), poli -tiofene (PTh), poli-p-fenilene vinilene (PPV), poli-pirrolo (PPy) e poli-anilina (PANI) sebbene siano di natura organica, sono elettricamente conduttivi e ampiamente utilizzati in biosensori elettrochimici (vedi figura 2.10).

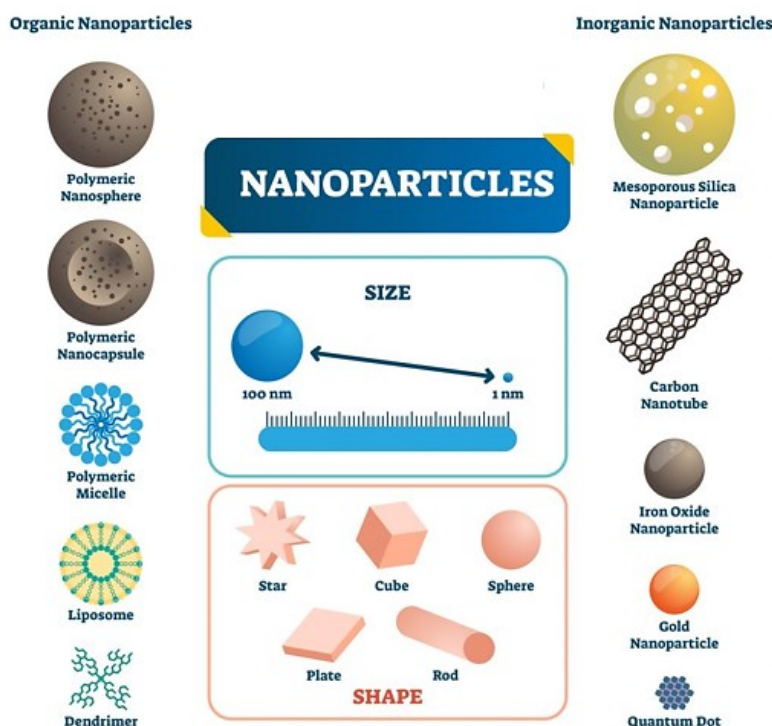


Figura 2-10: Natura, forma e sezioni delle nanoparticelle.

2.5.1 Funzionalizzazione dei nanomateriali nella ingegneria di superficie

L'ingegneria della nano-superficie dell'elettrodo di rilevamento è di grande importanza, in quanto è direttamente responsabile dell'integrità degli strati di rilevamento. Gli elettrodi di rilevamento coinvolgono uno strato di nano-bio-interfaccia dove gli E-BR sono immobilizzati per interagire con le molecole dell'analita per generare un segnale. La connessione E-BR ai nanomateriali dovrebbe essere stabile e abbastanza consistente da generare un segnale uniforme dopo l'interazione con l'analita in vari ambienti fisiologici. Un'adeguata strategia di funzionalizzazione delle NP può essere seguita per garantire un particolare numero di biomolecole per NP, il corretto orientamento degli E-BR sulle NPs, la distanza di separazione relativa degli E-BRs dalle NPs, l'affinità di attacco modulabile.

L'obiettivo di questo metodo è quello di garantire la funzione e le attività ottimali delle biomolecole, e riproducibilità del metodo in modo semplice con una varietà di molecole biologiche. Questi sono i principali obiettivi per i quali è necessaria l'ingegneria di superficie nei biosensori, mostrata in Figura 2.11.

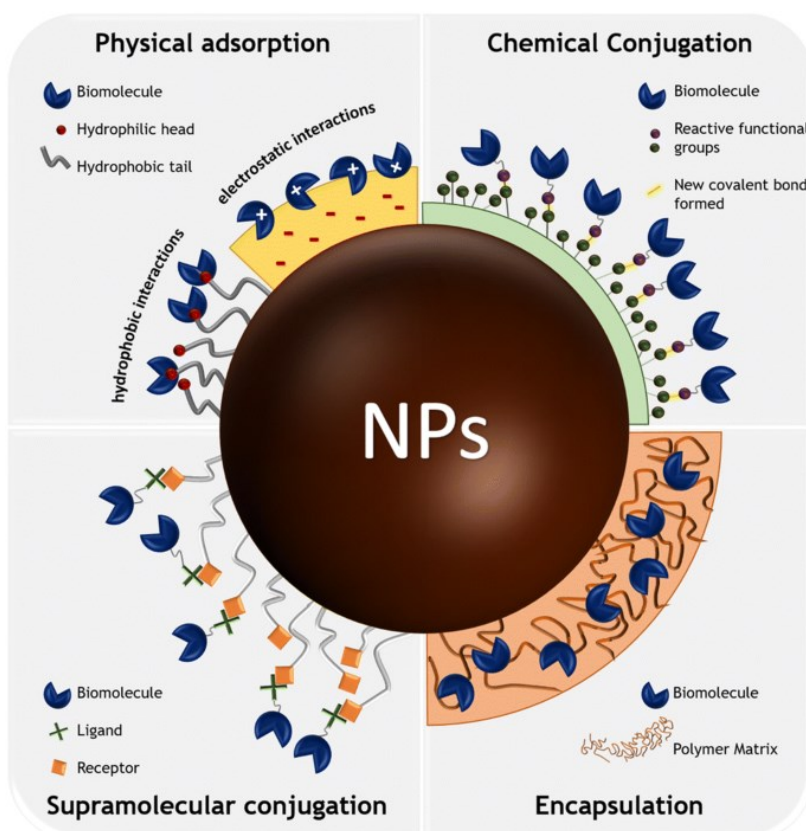


Figura 2-11: La coniugazione biomolecolare efficace sulle NPs

Le strategie di coniugazione degli E-BR sui nanomateriali possono essere classificate in covalenti (reazioni di accoppiamento ammidico, reticolazione, ecc.) o interazioni non covalenti (interazione elettrostatica, π - π stacking, intrappolamento in polimeri, ecc.).

Una rappresentazione grafica delle principali strategie di immobilizzazione è mostrata. Tra queste, l'adsorbimento fisico è una tecnica di immobilizzazione semplice, in cui la biomolecola, come ad esempio una proteina viene adsorbita sulla superficie di un nanomateriale per interazioni di tipo elettrostatico, idrofobico, di van der Waals o per formazione di legami idrogeno. Tuttavia, queste interazioni sono sensibili al cambiamento di pH, forza ionica, alla temperatura e alle condizioni della superficie per questo motivo, le più forti reazioni covalenti sono preferite per lo sviluppo di biosensori (Rabe, et al., 2011), (Norde, et al., 1986). Tra tutte le interazioni covalenti, carbodiimide e le interazioni biotina-avidina sono più comunemente usate in applicazioni di biosensing (Figura 2.12 e 2.13).

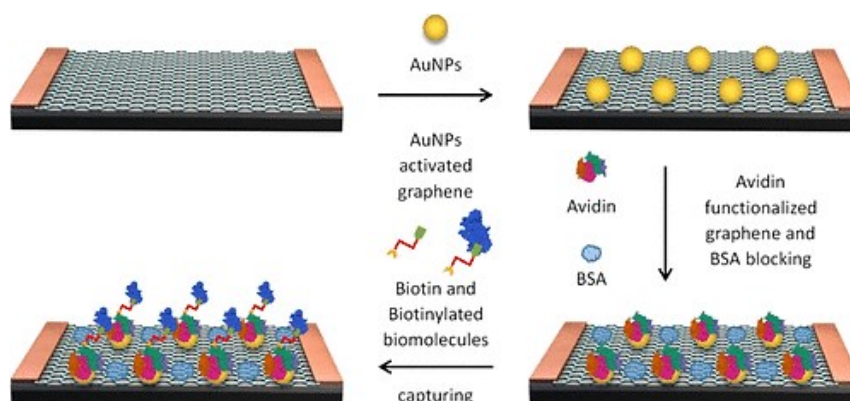


Figura 2-12: Interazioni biotina-avidina su elettrodo in grafite per biosensing.

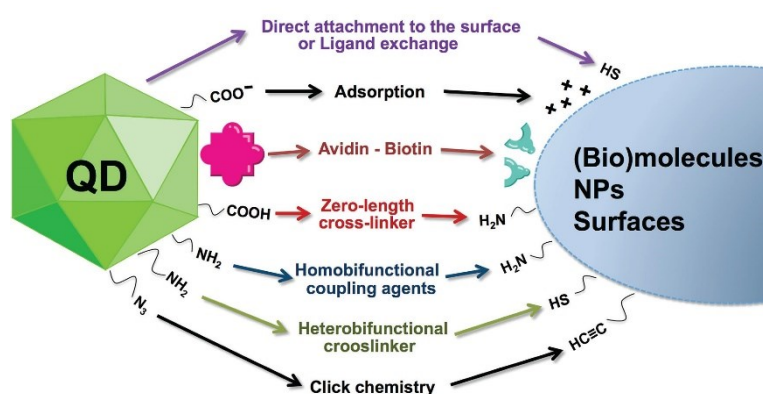


Figura 2-13: Strategie di coniugazione applicate a Quantum Dots di semiconduttori fluorescenti comunemente usati in applicazioni di biosensing.

Recentemente, sono stati sviluppati metodi avanzati e potenti per saggi immunoenzimatici riproducibili, ad alta sensibilità, multiplexati e ad alta produttività, o saggi enzimatici come

l'immobilizzazione proteica fotoattivata, l'immobilizzazione attivata elettrochimicamente, l'immobilizzazione attivata termicamente, l'eluizione proteica fotoattivata, l'immobilizzazione proteica multiplexata spazialmente indirizzabile, l'immobilizzazione proteica reversibile per test ripetitivi e la superficie di immobilizzazione multifunzionale per una procedura di immobilizzazione semplificata.

2.5.2 Caratterizzazione di nanomateriali ed elettrodo di rilevamento

Negli ultimi anni il progresso del biosensore come dispositivo analitico è stato notevolmente influenzato dalla rivoluzione nel campo delle nanotecnologie. L'aumento di tecniche sofisticate, specialmente la microscopia elettronica, i raggi X e i metodi basati sulla spettroscopia portano ad un'ampia caratterizzazione delle NPs. Tuttavia, i ricercatori affrontano molteplici problemi durante la caratterizzazione dei nanomateriali a causa della variazione nella preparazione dei campioni, la mancanza di un codice universale per l'analisi dei dati, la mancanza di materiale di riferimento adatto per la calibrazione degli strumenti analitici utilizzati e l'analisi delle NPs in matrici complesse, ecc. (Anumolu, et al., 2012). Quindi, è importante caratterizzare le NPs nel miglior modo possibile per disporre di informazioni affidabili sulla loro forma, legante di superficie, cinetica di crescita e la sua interazione con i materiali circostanti. Tutti questi parametri influenzano notevolmente il suo comportamento sull'elettrodo e la sua successiva attività di biosensing.

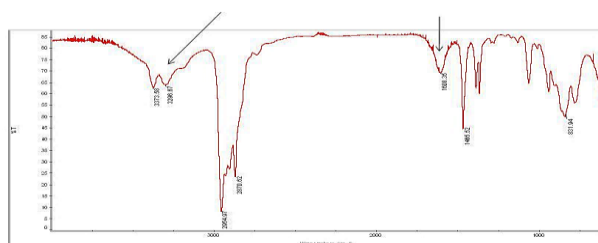
Tra tutte le tecniche possibili, l'UV-Vis (Spettroscopia ultravioletta/visibile) è di solito la prima tecnica di caratterizzazione eseguita per monitorare la formazione di una nanoparticella osservando le bande di assorbimento caratteristiche. Un nanomateriale ben disperso in una soluzione dà una banda di assorbimento caratteristica in base alla dimensione dei grani, alla concentrazione, allo stato di agglomerazione e all'indice di rifrazione, e può anche essere usato per determinare la stabilità della NP in soluzioni colloidali. I microscopi elettronici sono invece utilizzati per visualizzare le dimensioni e la forma del nanomateriale in modo più dettagliato, dove il fascio di elettroni è utilizzato per ottenere una risoluzione a livello atomico. Nel SEM, il fascio di elettroni esegue una scansione sulla superficie delle NPs, e gli elettroni secondari vengono utilizzati per ottenere un'immagine 3D delle caratteristiche della superficie. Anche se con il SEM non è possibile raggiungere la risoluzione su scala atomica, è comunque utile per studiare una superficie più ampia e materiali sfusi come i film sottili. Il TEM può raggiungere una risoluzione più alta, meno di 10^{-1} nm rispetto al SEM, dove i fasci di elettroni trasmessi passano attraverso un campione sottile e il contrasto del campione con l'ambiente circostante viene studiato per ottenere informazioni sul materiale. Il SAED (Selected area electron diffraction) viene anche eseguito con il TEM per conoscere la struttura

cristallina, la spaziatura interplanare e altri parametri reticolari delle NPs. Questa tecnica basata sulla diffrazione è spesso usata in combinazione con tecniche basate sui raggi X. La XRD (Diffrazione dei raggi X) è una parte inseparabile della caratterizzazione delle NPs, utilizzata per ottenere informazioni sulla struttura cristallina, la natura della fase, i parametri di reticolo e la dimensione dei grani cristallini (secondo la formula di Scherrer) spesso necessari per spiegare il comportamento ottico ed elettronico delle NPs.

La funzionalizzazione della superficie dei nanomateriali e la fabbricazione della sonda sono monitorate da varie tecniche di caratterizzazione, come FTIR (Spettroscopia IR a trasformata di Fourier), spettroscopia Raman, EDX (Spettroscopia a raggi X a dispersione di energia), mappatura elementare e XPS (Spettroscopia fotoelettronica a raggi X). Una sonda bio o chimicamente modificata viene studiata in FTIR, dove uno spettro nella regione dell'infrarosso medio (range 4000-400 cm^{-1}) fornisce informazioni riguardanti la natura e la forza di vari legami e gruppi funzionali. La FTIR è una delle tecniche di caratterizzazione più importanti per studiare la struttura e le interazioni delle NPs. Alcuni esempi di frequenze FTIR di alcuni dei gruppi funzionali più comuni sulle NPs e elettrodo sonda sono i seguenti:

Modalità vibrazionali	Frequenza (cm^{-1})
Stiramento metilico C-H asimmetrico/simmetrico	2970–2950/2880–2860
Deformazione metilica C-H asimmetrica/simmetrica	1470–1430/1380–1370
Stiramento C=C alchilico	1680–1620
Stiramento C-H aromatico	3130–3070
O–H gruppo ossidrilico, legame H stiramento OH	3570–3200 (broad)
C–O Stiramento, alcool primario	~1050
N–H ammina primaria alifatica, NH stiramento	3400–3380, 3345–3325
N–H ammina primaria, NH deformazione	1650–1590

Isobutyl amine
NH stiramento (stretch), NH deformazione (bend)



C–N, ammina primaria, CN stiramento	1090–1020
Carbossilato	1610–1550/1420–1300
Fosfati organici (P=O stiramento)	1350–1250

Fosfati alifatici (P–O–C stiramento)	1050–990
Solfonati	1365–1340/1200–1100
Silossano organico o silicone (Si–O–Si)	1095–1075/1055–1020
Silossano organico o silicone (Si–O–C)	1100–1080
Tioli (S–H stiramento)	2600–2550
Tiolo o tioetere, CH ₂ –S– (C–S stiramento)	710–685
Clorocomposti alifatici, C–Cl stiramento	800–700
Ione ammonio	3300–3030/1430–1390

Un'altra tecnica per caratterizzare le molecole, è la spettroscopia Raman che si basa sulla diffusione anelastica della radiazione elettromagnetica e viene, utilizzata per studiare la forza dei legami inter/intramolecolari, l'effetto dei parametri ambientali sulle NPs, il grado di cristallinità, e molto altro. La diffusione Raman per risonanza (RRS) è usata principalmente per studiare le nanostrutture di carbonio, mentre il SERS (Spettroscopia Raman amplificata da superfici) è utilizzato prevalentemente per studiare l'adsorbimento di biomolecole sulla superficie di NP metalliche. Il rilevamento quantitativo, viene solitamente eseguito con altre tecniche, come ToF-SIMS (Spettrometria di massa a ioni secondari a tempo di volo) per studiare le proteine nelle NPs o plasmonica per studiare l'elettrochimica di singole molecole. La XPS, è un'altra tecnica ampiamente utilizzata per studiare le interazioni dei ligandi e la funzionalizzazione superficiale delle NP e delle strutture core-shell. L'EDX è usato per la mappatura elementare degli elementi nelle NP a livello atomico. Tutte le suddette tecniche di caratterizzazione sono utilizzate e convalidate in combinazione tra loro per valutare la proprietà complessiva delle NP.

Ogni modifica della sonda con NPs o biomolecole porta ad un'alternanza nel suo comportamento elettronico, che può essere valutato da varie tecniche elettrochimiche. Di seguito possiamo riassumere le tecniche elettrochimiche comunemente usate per la caratterizzazione di NPs e relative sonde elettrochimiche. Sulla base della tensione applicata/segnale di eccitazione/elettrodi, le tecniche voltammetriche sono denominate in modo diverso, tra cui CV (Cyclic Voltammetry) e DPV (Differential Pulse Voltammetry) sono le tecniche più comunemente usate in applicazioni di rilevamento. Il CV è usato per studiare il comportamento elettrochimico delle molecole, per determinare il potenziale redox di un analita e per la determinazione qualitativa. La diffusione dell'elettrolita dal campione alla

superficie dell'elettrodo è un passo limitante nel CV, che può essere quantificato usando l'equazione di Randles-Ševčík (Bard, et al., 2000), (Wang, et al., 2006).

$$i_p = 0,4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o^* v^{1/2} \quad (5)$$

$$i_p = (268648 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o^* v^{1/2} \quad (6)$$

Nella voltammetria ciclica, l'equazione di Randles-Sevcik (5), esprime la corrente di picco in funzione della velocità di scansione: o per una soluzione alla temperatura di 298,15 K: dove:
 * i_p = intensità della corrente di picco [A] * n = numero di elettroni scambiati * A = area elettrodica [cm²] * D = coefficiente di diffusione dell'analita [cm²/S] * v = velocità di scansione del potenziale [V/S] * C = concentrazione [mol/cm³] * F = costante di Faraday [C/mol] * R = costante universale dei gas [J/(mol K)] * T = temperatura [K].

Inoltre, il rapporto tra i_{pc} (catodico) e i_{pa} (picchi anodici), e la differenza tra i loro potenziali in CV rivelano la reversibilità di una reazione. Un rapporto di corrente di picco più vicino a (-1) e la differenza di potenziale a $2,3RT/nF$, indica la reversibilità della reazione. Dove R è la costante del gas costante di gas, T è la temperatura, n è il numero di elettroni coinvolti nelle reazioni e F è la costante di Faraday. Di nuovo, il numero di elettroni coinvolti in una reazione può essere calcolato in base allo spostamento del picco della tasso di scansione in un voltammogramma usando l'equazione di Laviron. La DPV è una tecnica più sensibile del CV grazie all'effetto di campionamento a doppia corrente e viene utilizzata per la determinazione quantitativa dell'analita a basse concentrazioni. In un'altra tecnica elettrochimica, EIS, la corrente alternata (AC) è usata per indurre reazioni elettrochimiche sull'elettrodo di lavoro per studiare in generale la cinetica elettrochimica di superficie di rilevamento. Il risultato di questo è tracciato come il diagramma di Nyquist e il diagramma di Bode. Dallo studio EIS, la costante di velocità di trasferimento degli elettroni eterogenei (K_s) può essere misurata per diversi elettrodi utilizzando l'equazione. (7).

$$R_{CT} = \frac{RT}{n^2 F^2 A K_s} \quad (7)$$

Dove R è la costante dei gas, T è la temperatura, n è il numero di elettroni coinvolti nella reazione, F è la costante di Faraday, A è l'area dell'elettrodo, C è la concentrazione dell'elettrolita.

Oltre a queste, le tecniche di voltammetria di stripping, come lo stripping anodico, stripping catodico e la voltammetria di stripping adsorbente viene utilizzata per la rilevazione sensibile dell'analita. La corrente generata come un picco durante lo stripping dell'analita dall'elettrodo nella voltammetria a stripping anodico è più sensibile di qualsiasi altra tecnica di rilevamento elettrochimico.

Di seguito si riportano le diverse tecniche di caratterizzazione elettrochimica utilizzate nel biosensing e i loro corrispondenti parametri di ingresso e uscita dell'elettrodo:

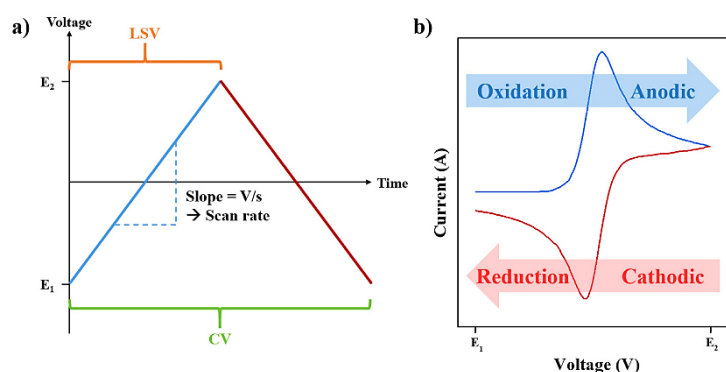


Figura 2-14: Voltammetria ciclica - Segnale di Input (a), Segnale di Output (b)

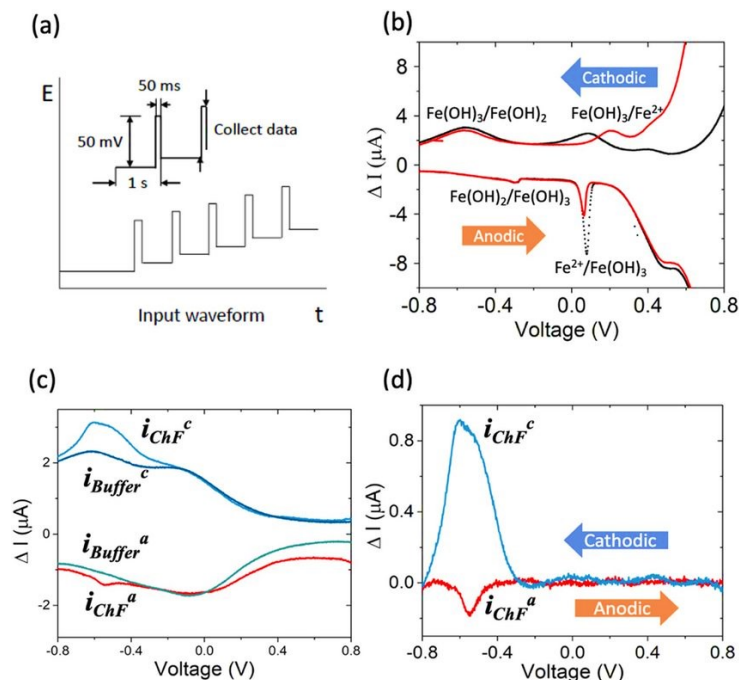


Figura 2-15: Voltammetria differenziale a impulsi - Segnale di Input (a), Segnale di Output (b)

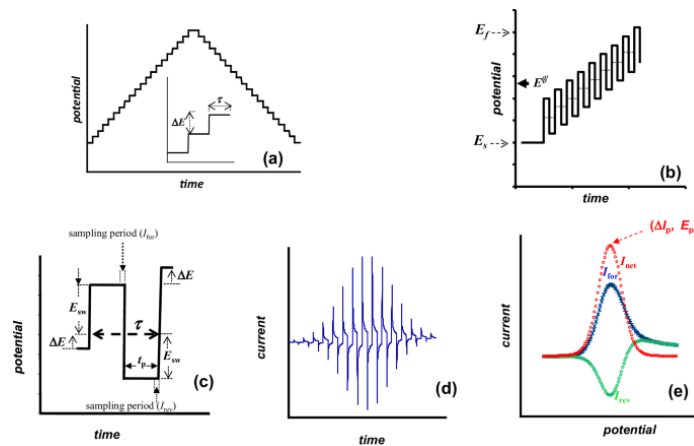


Figura 2-16: Voltammetria a scala Segnale di Input (a) Voltammetria ad onda quadra Segnale di Input (b), Segnale di Output (e)

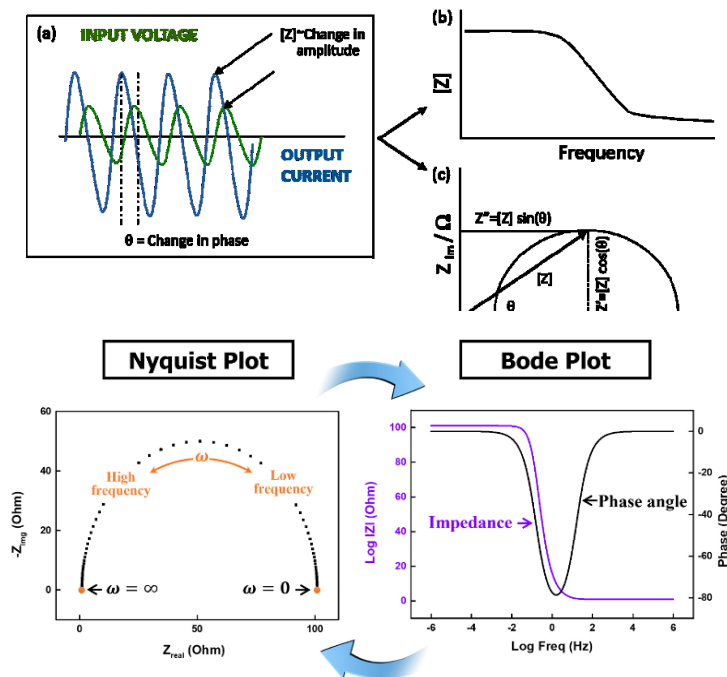


Figura 2-17: Spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS) Segnale di Input (a), Segnale di Output (b)

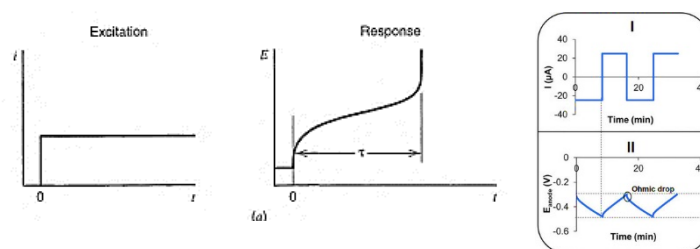


Figura 2-18: Cronopotenziometria (corrente costante)

2.5.3 Studio delle prestazioni analitiche dei biosensori

Dopo la fabbricazione della sonda (elettrodo), i biosensori vengono valutati sulla base di una serie di prestazioni analitiche di tipo standard. Gli studi preliminari che coinvolgono la superficie di rilevamento degli elettrodi sono condotti con lo scopo di valutare la sensibilità e selettività verso l'analita target, quindi sviluppando grafici di regressione basati sull'uscita del segnale con concentrazioni variabili di molecole di analita che viene poi utilizzato come standard per ulteriori applicazioni di rilevamento.

Sulla base del diagramma di regressione/trama di calibrazione, queste prestazioni analitiche dei biosensori sono valutate in termini matematici come ad esempio:

1) Sensibilità

La sensibilità di un biosensore è definita come la pendenza della linea di regressione, che indica un cambiamento nel segnale di uscita alla fluttuazione nella concentrazione dell'analita. Il biosensore con una pendenza più ripida è più sensibile e in grado di distinguere un cambiamento molto piccolo nella concentrazione dell'analita in una soluzione. La sensibilità può essere espressa come segue:

$$S_{\text{SENSIBILITÀ}} = \frac{Y_Q - Y_P}{X_Q - X_P} \quad (8)$$

dove X_P e X_Q sono due concentrazioni di analiti nel diagramma di calibrazione mentre Y_P e Y_Q sono i loro segnali corrispondenti.

2) Limite di rilevamento (LDR)

La quantità minima di analita che può dare un segnale distinguibile, cioè il segnale nel meccanismo di biosensing noto come LDR. Il LDR è generalmente calcolato utilizzando l'equazione (9):

$$LDR = \frac{3SD_{\text{Bianco}}}{S_{\text{SENS.}}} \quad (9)$$

dove **LDR** è il limite di rilevazione; **SD_{Bianco}** è la deviazione standard del bianco (della miscela in tutto e per tutto uguale al campione da analizzare ma priva degli analiti di interesse) mentre **Sens.** è la sensibilità della sonda per il particolare analita.

3) Limite di quantificazione (LDQ)

La quantità minima di analita target che può essere rilevata da un biosensore è nota come LDQ. Il LDQ può essere espresso matematicamente utilizzando l'equazione (10):

$$LDQ = \frac{10DS_{Bis\text{enso}}}{S_{ENS.}} \quad (10)$$

Va notato che il LDQ potrebbe essere uguale o superiore al LDR, ma non può essere inferiore al LDR.

4) Range dinamico lineare (RDL)

RDL è l'intervallo di concentrazione dell'analita nel grafico di regressione, dove il segnale alterato è direttamente proporzionale alla fluttuazione delle concentrazioni dell'analita. I biosensori sono progettati di conseguenza per avere un RDL più ampio per coprire la concentrazione clinicamente significativa dell'analita. Oltre ai parametri di rilevamento basati sulla linea di regressione, altri parametri analitici utilizzati per valutare le prestazioni dei biosensori sono:

a. Selettività

La selettività è la proprietà di un biosensore di distinguere l'analita target da altre molecole e produrre un segnale in uscita solo contro l'analita target. Specificità e selettività sono due importanti parametri spesso usati in modo intercambiabile nella letteratura sui biosensori. La specificità è la condizione ideale, in cui i biosensori riconoscono solo un singolo analita target anche in una soluzione complessa. La specializzazione può essere raggiunta utilizzando aptamers, anticorpi o coppie di coniugazione biotina-avidina. La selettività è la proprietà di rilevare un gruppo di molecole strettamente correlate.

b. Tempo di risposta

Il tempo richiesto da un biosensore per generare un segnale rispetto a una concentrazione di analita o il tempo impiegato dal sensore per catturare un numero rilevabile di molecole di analita sulla sua superficie. La microfluidica, cattura dell'analita mediante sfere Cu distribuite in soluzione, ed i nano/micromotori sono alcune delle strategie utilizzate per ridurre il tempo di risposta di un biosensore.

c. Tempo di recupero

Il tempo richiesto da un biosensore per essere pronto per il secondo ciclo di rilevamento dopo aver completato il primo ciclo è chiamato tempo di recupero. Un biosensore ideale ha un ampio RDL, basso LDR, alta sensibilità, alta selettività, un tempo di risposta veloce, un basso

tempo di recupero e una lunga durata di conservazione. I biosensori sono progettati per rilevare l'analita in modo sensibile nell'intera gamma clinicamente significativa.

d. Analisi di campioni reali

I biosensori sono idealmente sviluppati per il rilevamento di analiti di importanza clinica in vari fluidi o campioni biologici. Quindi, dopo la convalida delle prestazioni analitiche del biosensore, vengono analizzati i campioni clinici. La concentrazione dell'analita viene quantificata utilizzando il diagramma di calibrazione sviluppato in precedenza. Tuttavia, a volte, quando il campione clinico non è disponibile, vengono seguiti metodi di recupero dei picchi e di aggiunta standard per imitare il campione reale. La soluzione mimica viene preparata aggiungendo molecole coesistenti o strutturalmente simili. Nel metodo spike-recovery, una concentrazione nota dell'analita viene iniettata nella soluzione di rilevamento e la sua concentrazione viene misurata dal sensore prendendo la curva di calibrazione come lo standard. Matematicamente questo può essere spiegato con l'equazione (11):

$$\% \text{Recupero} = \frac{\text{CAO}}{\text{ECA}} \cdot 100 \quad (11)$$

(dove CAO è il valore della concentrazione di analita osservato dopo il dosaggio dell'analita; Neat è il valore della concentrazione dell'analita presente nel campione prima della miscelazione; ed ECA è l'esatta concentrazione dell'analita aggiunto al campione). Se la risposta di recupero è vicina al valore picco, allora non c'è alcun effetto delle molecole coesistenti sulla generazione del segnale. Se la risposta di recupero è significativamente più alta del valore di picco, è dovuta a risultati falsi positivi. Allo stesso modo, una risposta di recupero molto bassa è un risultato falso positivo che può essere dovuto all'interazione della sonda di rilevamento con un analita non specifico. Nel metodo di addizione standard, viene sviluppato un grafico di calibrazione aggiungendo una quantità nota di analita nella soluzione di rilevamento. Poi il campione sconosciuto viene trattato con il sensore e la concentrazione di analita in esso può essere calcolata tracciando i punti alle concentrazioni zero nel grafico standard.

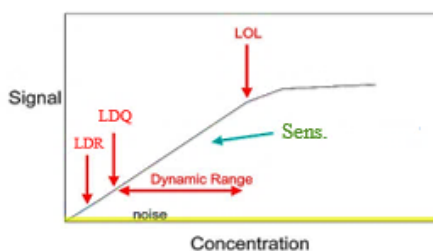


Figura 2-19: Sensibilità e Range dinamico.

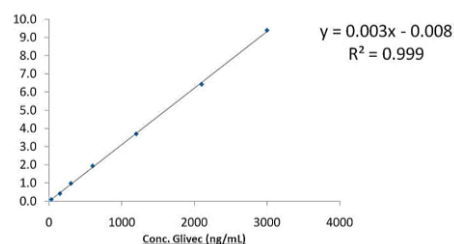


Figura 2-20: Curva di calibrazione

2.5.4 Sviluppo della sonda per il biosensing

Una sonda bio-sensoristica è progettata per ottenere prestazioni analitiche ottimali in una vasta gamma di parametri fisici come il pH, la forza ionica, la temperatura, ecc. Di seguito si riportano le fasi coinvolte nella progettazione della sonda di rilevamento:

- a) Selezione della matrice di rilevamento: In base al tipo di trasduttore viene scelta la matrice (esempi GCE, ITO o carta).
- b) Ingegneria della superficie: Include la selezione del nanomateriale adeguato e le strategie di funzionalizzazione chimica.
- c) Selezione e immobilizzazione degli E-BR: Anticorpo, enzima o aptamero viene selezionato in base alla natura dell'analita e immobilizzato correttamente per mantenere la sua funzione ottimale.
- d) Concetti di miglioramento del segnale: Varie strategie verranno adottate per amplificare il segnale di rilevamento, che è essenziale per misurare basse quantità di analita. Nei biosensori basati sulla voltammetria, le NP sono usate per aumentare la conduttività e l'attività catalitica del sensore per migliorare il segnale. Un altro metodo usa anticorpi secondari marcati con enzimi per catalizzare un'ulteriore reazione per migliorare il segnale e aiutare ad ottenere un risultato quantitativo. Va notato che questo enzima migliora il segnale, ma non ha ruolo diretto nel riconoscimento dell'analita. Un sistema a cascata multi-enzima è anche usato per migliorare il segnale. Si riporta anche l'uso di uno RNAsform kits per estrarre una quantità di analita direttamente dal tessuto corporeo per essere rilevato dal sensore.
- e) Sviluppo di un grafico dipendente dalla concentrazione (o dalla dose), che viene utilizzato come standard per ulteriori studi.
- f) Successivamente si prevede la valutazione dell'effetto di fouling delle molecole Co-molecole esistenti sulla generazione del segnale. Se la matrice di rilevamento ha un effetto negativo sulla generazione del segnale, verranno adottate le superfici di antifouling o specifiche metodologie per limitare al minimo la riduzione del segnale.
- g) Sistema di rilevamento in tempo reale: La sonda del sensore è calibrata per il rilevamento quantitativo di un analita in una soluzione biologica complessa in presenza di molte molecole coesistenti.

2.5.5 Aspetti salienti di studio nella realizzazione dei biosensori

I biosensori sono desiderati per funzionare in sistemi complessi senza alcuna calibrazione in loco o fase di preparazione del campione, il che può aiutare persone semispecializzate a far funzionare facilmente i biosensori. L'errore nella generazione del segnale in fase di utilizzo dovrebbe essere minimo, per tale motivo varie strategie si possono adottare per ottenere un basso livello percentuale di errore. Molti ricercatori hanno sviluppato serie di immunosensori SPR senza calibrazione per rilevare gli antigeni leucocitari umani (HLA) nel siero, mentre altri hanno sviluppato una serie di biosensori basati su aptameri senza calibrazione, dove il cambiamento di segnale indotto dal legame è insensibile alle variazioni nella fabbricazione della superficie del sensore. Un rapporto tra il segnale di voltammetria a onda quadra responsivo e on-responsivo è stato utilizzato per la determinazione di cocaina, doxorubicina e kanamicina. Negli ultimi anni sono stati sviluppati altri biosensori privi di calibrazione per la fenilalanina, dove il legame specifico dell'aptamer con un complesso di fenilalanina e un recettore a base di rodio ed è stato monitorato utilizzando un indicatore redox per determinare la concentrazione dell'analita utilizzando la voltammetria ad onda quadra. L'assorbimento e il fouling sulla superficie del sensore da parte di molecole biologiche e chimiche sono le maggiori limitazioni per lo sviluppo di sensori senza calibrazione, anche se le tecnologie dei sensori devono migliorare ancora molto per essere veramente senza calibrazione.

2.5.6 Sensori basati su superfici anti-fouling

L'adsorbimento/precipitazione/polimerizzazione di molecole biologiche non specifiche, macromolecole o sostanze chimiche non specifiche (come proteine, lipidi o cellule) sulla superficie del sensore causano un grande rumore, ostacolano le interazioni analita – E-BRs e portano ad un'uscita del segnale non specifica. Questo fenomeno, chiamato fouling è un problema universale nel rilevamento in vivo in tutti i tipi di biosensori. Il rivestimento superficiale idrofilo, il rilascio di ossido nitrico e innovazione nell'elettrodo di riferimento sono utilizzati per evitare tali inconvenienti. Uno strato anti-fouling sulla superficie del sensore non solo aumenta l'affidabilità del risultato del sensore ma anche prolungare la durata del sensore.

Vari polimeri come il polietilenglicole (PEG), idrogel conduttivi, peptidi, strato SAM, DNA ternario mono strato sono utilizzati per ridurre gli effetti di fouling. Generalmente viene usato materiale poroso reticolato in BSA-glutaraldeide (GA) incorporato con nanorod di Au per ridurre l'effetto fouling nella matrice di rilevamento. Ad esempio con questo ultimo tipo di materiale il sensore può rilevare in modo sensibile anche dopo aver esposto l'elettrodo a

campioni di siero umano per un mese in quanto i pori nel BSA-GA hanno escluso le molecole proteiche più grandi e l'anticorpo coniugato ha interagito solo con l'antigene specifico.

2.5.7 I nanozimi

I nanozimi sono i nanomateriali che presentano proprietà simili agli enzimi idonei a catalizzare un particolare insieme di reazioni. Anche se gli enzimi naturali sono molto più diversificati e superiori in specificità verso il substrato, i nanozimi sono sviluppati per le loro attività catalitiche regolabili, basso costo, alta stabilità, robustezza in ambienti difficili e facilità di funzionamento. I nanozimi vengono utilizzati anche per le loro proprietà fisico-chimiche uniche come la fluorescenza, l'elettricità, proprietà paramagnetiche. Vari nano materiali come quelli a base di carbonio quali i CNT, SWNT, GO, nanodots di carbonio, NPs di metallo (es. AuNPs), nano materiali a base di ossido di metallo ad esempio CeO_2 vengono utilizzati come nanozimi in base al loro meccanismo catalitico raggruppati in due classi, cioè ossidoreduttasi e idrolasi.

2.6 Conclusioni

I biosensori sono dispositivi bioanalitici sviluppati per il rilevamento sensibile di analiti in modo quantitativo. Dalla loro nascita con l'elettrodo di Clark ai moderni biosensori, il campo della ricerca ha fatto grandi passi avanti. Ottica, meccanica ed elettrochimica sono le principali classi di biosensori, in cui le innovazioni sono state ampiamente implementate per renderli più efficienti e pronti per le applicazioni nella vita quotidiana. Tutti questi biosensori sono stati sviluppati per rilevare in modo sensibile una quantità molto bassa di analita in una matrice biologica complessa, con un basso volume di campione e senza effetto fouling. Vengono seguite diverse strategie per rendere il biosensore stabile ed efficace per un periodo più lungo. I nanomateriali e la chimica di superficie sono ampiamente utilizzati per fissare efficacemente le molecole E-BR e creare una superficie anti-incrostazione per mantenere la sensibilità per un periodo più lungo. Tuttavia, i biosensori devono affrontare molte sfide prima di essere ampiamente applicati nella vita quotidiana.

I nanomateriali utilizzati nei biosensori devono essere funzionali e funzionare a pH fisiologico, a temperatura ambiente o corporea, in condizioni ambientali, e rimanere stabili per un periodo più lungo. La fabbricazione di nanomateriali aumenta la superficie effettiva e l'intensità del segnale, ma non il rapporto segnale/rumore, che dovrebbe essere affrontato per sviluppare biosensori migliori. I biosensori enzimatici dovrebbero introdurre innovazioni per l'uso degli enzimi, soprattutto quando il centro di catalisi è incorporato nella sua struttura 3D

o richiedere un cofattore per la catalisi. La priorità dovrebbe essere la produzione di massa di biosensori senza compromettere la sensibilità.

Capitolo 3

SPETTROSCOPIA DI BIO-IMPEDENZA: NOZIONI E APPLICAZIONI IN BIOFEVI

Le tecniche della spettroscopia di impedenza elettrica (EIS) nelle applicazioni biologiche e mediche, portano alla definizione di nuovi aspetti teorici e sperimentali che si traducono in nozioni essenziali per gli studi biologici, come l'interazione degli elettrodi metallici con la materia e i liquidi biologici, le strategie per aumentare l'impedenza elettrica, le strategie per aumentare la velocità di misura e la riduzione del rumore negli esperimenti di bio-EIS, ecc. Diversi esempi di successo di implementazioni pratiche di bio-EIS nella scienza e nella tecnologia come in quella del BioFEVI si traducono nel monitoraggio della salute dell'intero corpo e nella cura delle patologie visive mediante l'utilizzo di sensori, alle piattaforme per l'esame di singole cellule viventi e alla ricerca sulle malattie virali. Grazie ai lavori di ricerca contemporanei nel campo della bio-EIS tutto questo ad oggi è reso possibile ma molto altro dovrà essere fatto.

3.1 Aspetti teorici del Bio-EIS

La spettroscopia di impedenza elettrica EIS fu concepita circa 136 anni fa dallo scienziato Oliver Heaviside che adattò i numeri complessi allo studio dei circuiti elettrici evolvendo di fatto questa tecnica sperimentale potente e ampiamente utilizzata in molti contesti scientifici.

Ad esempio, l'EIS è comunemente utilizzata come tecnica di test per i moderni dispositivi elettronici che vanno dai semiconduttori alle etero-strutture agli amplificatori audiofonici; l'EIS è una tecnica all'avanguardia utilizzata nell'elettrochimica e nella scienza dei materiali capace di investigare materiali quali i nano-oggetti e adatto alla caratterizzazione di fonti di energia alternativa e alla ricerca sulla superficie di Marte. Essendo una tecnica label-free non distruttiva e facile da implementare, l'EIS è diventata un approccio sperimentale promettente nelle applicazioni biologiche e mediche, come le tecnologie di biosensing e la diagnosi di malattie, tra cui il cancro e il rilevamento di virus. I notevoli progressi nella fabbricazione di nuovi dispositivi microelettronici hanno esteso le applicazioni dell'EIS sullo studio di un'ampia gamma di cellule viventi, comprese le cellule di mammifero, dando vita ad una

nuova tecnologia di rilevamento dell'impedenza elettrica cellula-substrato (ECIS), che da decenni è diventata uno strumento eccezionale per la ricerca sulle cellule senza etichetta e in tempo reale. Il dispositivo ECIS utilizza una piastra di Petri modificata con elettrodi planari sul fondo su cui vengono seminate le cellule viventi da studiare. Per quanto riguarda le cellule, queste influenzano in modo significativo l'impedenza degli elettrodi (McCoy, et al., 2005) quindi diventa possibile determinare le loro proprietà studiando l'impedenza dell'ECIS e la sua evoluzione. Ad esempio, la metodologia ECIS permette di misurare il numero di cellule aderenti agli elettrodi, stimare la vitalità delle cellule, studiare la motilità delle cellule, indagare le interazioni cellula-cellula, quantificare l'attività di farmaci (Grovera, et al., 2011).

3.1.1 Immittanza o limitazione elettrica, un aspetto fondamentale

L'impedenza è una resistenza elettrica a valore complesso che dipende dalla frequenza ω della tensione di eccitazione (TE). In genere, l'impedenza è indicata come Z , o $Z(\omega)$, sottolineando la dipendenza dalla frequenza. Una quantità strettamente correlata è l'ammettenza, o conduttività a valore complesso, che si definisce come conduttività $1/Z$ e tipicamente è indicata come Y . Dalle quantità complesse di impedenza e di ammettenza, è possibile ricavare una serie di caratteristiche significative, tra cui le parti reali (indicate con R o con l'apostrofo '), le parti immaginarie (le cosiddette reattanze¹, indicate con X , $\mathcal{X}$ o con il doppio apostrofo "). Per comodità, per riferirsi all'impedenza, all'ammettenza o a qualsiasi grandezza fisica che sia una funzione dell'**impedenza** o dell'**ammettenza** fisica, si userà il termine generico di **immittanza** (limitazione). Per la tensione di eccitazione sinusoidale a singola frequenza (TE) si avrà l'equazione (12)

$$V(t) = V_0 e^{i\omega t} \quad (12)$$

l'immittanza potrebbe essere misurata come mostrato nella Figura 3.1. Se un campione è lineare, cioè il principio di sovrapposizione delle tensioni di eccitazione e delle corrispondenti

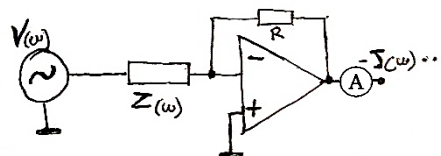


Figura 3-1: Schema di misura dell'immittanza. La tensione di eccitazione $V(\omega)$ viene applicata al campione con impedenza $Z(\omega)$, che determina una risposta di corrente $J(\omega)$ attraverso di esso. La tensione di eccitazione e la risposta di corrente vengono misurate in uscita dall'operazionale.

Nota¹: La Reattanza (Im) $\rightarrow$ è l'opposizione alle cariche di corrente di scorrere nel circuito

Reattanza (Re) $\rightarrow$ è l'incapacità della corrente di scorrere dentro il circuito

L'impedenza $Z = R + jX$ con X la reattanza; Reattanza capacitativa $X_c = 1/\omega c$, Imp.Capacitativa $Z = V/I = 1/j\omega c = -j/\omega c$

risposte di corrente è soddisfatto, anche la risposta in corrente sarà una funzione sinusoidale con frequenza ω (equazione 13)

$$J(t) = J_0 e^{i\omega t + i\phi} \quad (13)$$

dove $J_0 = J_0(\omega)$ è la grandezza della corrente, $\phi = \phi(\omega)$ è lo sfasamento della corrente rispetto alla tensione applicata. Quindi, secondo la legge di Ohm, l'impedenza a frequenza ω può essere definita come

$$Z(\omega) = \frac{1}{Y(\omega)} = \frac{V(t)}{J(t)} = \frac{V_0}{J_0} e^{-i\phi} = |Z| e^{i\phi} = Z' + iZ'' \quad (14)$$

dove $|Z| = V_0/J_0$ è la grandezza dell'impedenza, $\phi = -\varphi$ è la fase dell'impedenza, $Z' = |Z| \cos \phi$ è la parte reale dell'impedenza, $Z'' = |Z| \sin \phi$ è la parte immaginaria dell'impedenza, notiamo anche che l'espressione (14) è indipendente dal tempo. Utilizzando il principio di sovrapposizione e l'equazione (14), possiamo facilmente calcolare la risposta della corrente per una tensione di eccitazione non sinusoidale di forma arbitraria. Va notato, inoltre, che una qualsiasi TE fisicamente realistica può essere rappresentata come somma di armoniche a singola frequenza della equazione (12) o, in forma più generale, come un integrale di Fourier:

$$V(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{V}(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (15)$$

Si può calcolare la risposta a ciascuna armonica della tensione di eccitazione utilizzando l'equazione (14). L'ampiezza V_0 dell'equazione (12) è naturalmente sostituita da $\tilde{V}(\omega)$ un'ampiezza complessa dell'armonica con frequenza ω . Nella fase successiva, si può calcolare la risposta di corrente complessiva come somma (o integrale) delle risposte di corrente a ciascuna frequenza

$$J(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\tilde{V}(\omega)}{Z(\omega)} e^{i\omega t} d\omega = \int_{-\infty}^{\infty} Y(\omega) \tilde{V}(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (16)$$

da questa equazione si evince che l'immittanza definisce completamente la corrente elettrica che attraversa il campione per una tensione di eccitazione arbitraria, o in altre parole, l'immittanza contiene informazioni complete sulle proprietà elettriche del campione. Ecco perché il concetto di immittanza è molto utile per la caratterizzazione elettrica. Inoltre, nonostante la definizione dell'immittanza nell'Equazione (14) sia applicabile solo a campioni lineari, è possibile estendere l'applicazione dell'EIS anche a sistemi non lineari. Ad esempio, si può utilizzare l'approssimazione di piccolo segnale, che è valida se l'ampiezza di una

tensione di eccitazione è abbastanza piccola da eliminare la non linearità del campione. In genere, in questo tipo di esperimenti, una grande tensione di offset costante viene aggiunta a un piccolo segnale alternato TE per ottenere ulteriori dati sperimentali. In particolare, questa tecnica rappresenta uno stato dell'arte per la diagnostica dei **semiconduttori**.

3.1.2 Concetto di circuito equivalente nella definizione di immittanza

Uno dei principali vantaggi dell'EIS come tecnica sperimentale è la possibilità di analizzare gli spettri di immittanza ottenuti mediante l'approccio dei circuiti equivalenti che la caratterizzano. L'idea chiave di questo metodo consiste nel costruire un circuito elettrico equivalente che abbia la stessa immittanza del campione analizzato. Ad esempio, un circuito equivalente per un diodo semiconduttore ideale è un circuito RC seriale, poiché la giunzione ($p-n$) ha una conducibilità nulla a corrente costante e un'alta conducibilità a corrente ad alta frequenza purché si assuma che la TE abbia un'ampiezza piccola e che gli effetti di rettificazione siano eliminati. Di conseguenza, possiamo associare la capacità nel circuito equivalente con una regione di carica spaziale della giunzione ($p-n$) e la resistenza nel circuito equivalente con la resistenza di massa della base del diodo. Alternativamente, per la membrana di una cellula vivente, un circuito equivalente adatto è il circuito RC parallelo, perché ha una bassa (ma non nulla) conduttività a corrente costante e una conduttività molto elevata a corrente ad alta frequenza. In questo caso, il condensatore corrisponde alla capacità geometrica della membrana cellulare, e il resistore corrisponde alla resistenza della membrana. Pertanto, l'approccio del circuito equivalente consente di associare direttamente lo spettro di immittanza ai fenomeni fisici e chimici del campione indagato e di estrarne le caratteristiche.

Per determinare la topologia del circuito equivalente del campione, è spesso utile un'analisi preliminare tracciando grafici speciali come il diagramma di Bode in termini di magnitudo e fase dell'immittanza in funzione della frequenza e il grafico di Nyquist, definito come la parte immaginaria dell'immittanza rispetto alla parte reale dell'immittanza, vedi figura 2.17. Il grafico di Nyquist è in realtà un grafico parametrico di queste due funzioni, il cui parametro è la frequenza. Come esempio di questa procedura, consideriamo un circuito RC seriale mostrato in Figura 3.2.

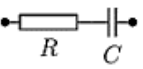
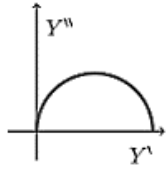
Circuito	Immittenza	Nyquist Plot	Metodo Algebrico
Serial RC 	$Z = R + \frac{1}{i\omega C}$		$R = \frac{1}{2Y''(\omega_{\max})},$ $C = \frac{2Y''(\omega_{\max})}{\omega_{\max}}.$

Figura 3-2: Circuito equivalente RC, Nyquist Plot Ammettenza e metodo algebrico AM

La sua impedenza e ammettenza sono descritte dalle seguenti equazioni (17) e (18)

$$Z = R + \frac{1}{i\omega C} = \sqrt{R^2 + \frac{1}{(\omega C)^2}} e^{-i \arctan[1/(\omega RC)]} \quad (17)$$

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{\omega^2 RC^2}{1 + (\omega RC)^2} + i \frac{\omega C}{1 + (\omega RC)^2} \quad (18)$$

dove R è la resistenza e C è la capacità. A basse frequenze l'impedenza del condensatore è elevata e il diagramma di Bode mostra un comportamento iperbolico. Alle alte frequenze l'impedenza del condensatore è bassa e l'impedenza totale è determinata dalla resistenza R e non dipende dalla frequenza.

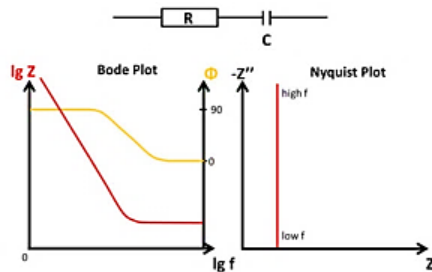


Figura 3-3: EIS di un circuito RC seriale, diagramma di Bode e Nyquist d'impedenza

Il diagramma di ammettenza di Nyquist del circuito RC seriale ha una forma a semicerchio (vedi Figura 3.2) con raggio $1/R$ e centrato nel punto $1/(2R) + i \cdot 0$, che si può facilmente dimostrare prendendo la grandezza $Y - 1/(2R)$. Pertanto, se il grafico dell'ammettenza di Nyquist di un campione misurato ha una forma a semicerchio, è molto probabile che il campione possa essere rappresentato come un circuito RC seriale. Può sorgere una domanda: perché per un circuito RC seriale consideriamo il luogo dell'ammettenza invece del luogo dell'impedenza, che ha una forma molto più semplice (la linea parallela all'asse immaginario alla distanza R)? La risposta a questa domanda è la seguente: la rappresentazione dell'ammettenza è molto utile nel caso del collegamento in parallelo di n circuiti RC seriali come mostrato nella figura 3.4

Circuito	Immittenza	Nyquist Plot	Metodo Algebrico
	$Z_1 = R_1 + \frac{1}{i\omega C_1}$ $Z_2 = R_2 + \frac{1}{i\omega C_2}$ $Z = Z_1 \parallel Z_2$		<i>Non esiste una soluzione semplice per il metodo algebrico</i>

Figura 3-4: Circuito equivalente RC in parallelo, Nyquist Plot Ammettenza.

Infatti, il luogo di ammettenza di tale sistema è una somma vettoriale di tutti i luoghi dei circuiti RC e, di conseguenza, il punto totale avrà una forma di n semicerchi sovrapposti. La forma analoga sarà osservata per l'impedenza dei circuiti RC paralleli collegati in serie. Quindi, il diagramma di Nyquist ci permette di determinare quanti circuiti RC da prendere in considerazione per costruire il circuito equivalente.

Quando si costruisce il circuito equivalente per il campione, i suoi parametri (valori di resistenza, capacità, ecc.) devono essere regolati in modo da far corrispondere lo spettro del circuito equivalente allo spettro osservato sperimentalmente. Per eseguire questo compito vengono comunemente usati: il metodo geometrico, il metodo algebrico (MA) e un metodo che rientra nel piano complesso e che tiene conto di particolari costrutti matematici. Nell'approccio geometrico, utilizzato nei primi studi sull'EIS, vengono eseguite operazioni grafiche con il locus dell'immittanza per valutare il circuito equivalente come nel seguente esempio dove il circuito RLC in serie mostrato è alimentato da una sorgente di tensione a frequenza variabile. Il luogo di ammettenza della rete RLC ai morsetti AB per una frequenza ω crescente è:

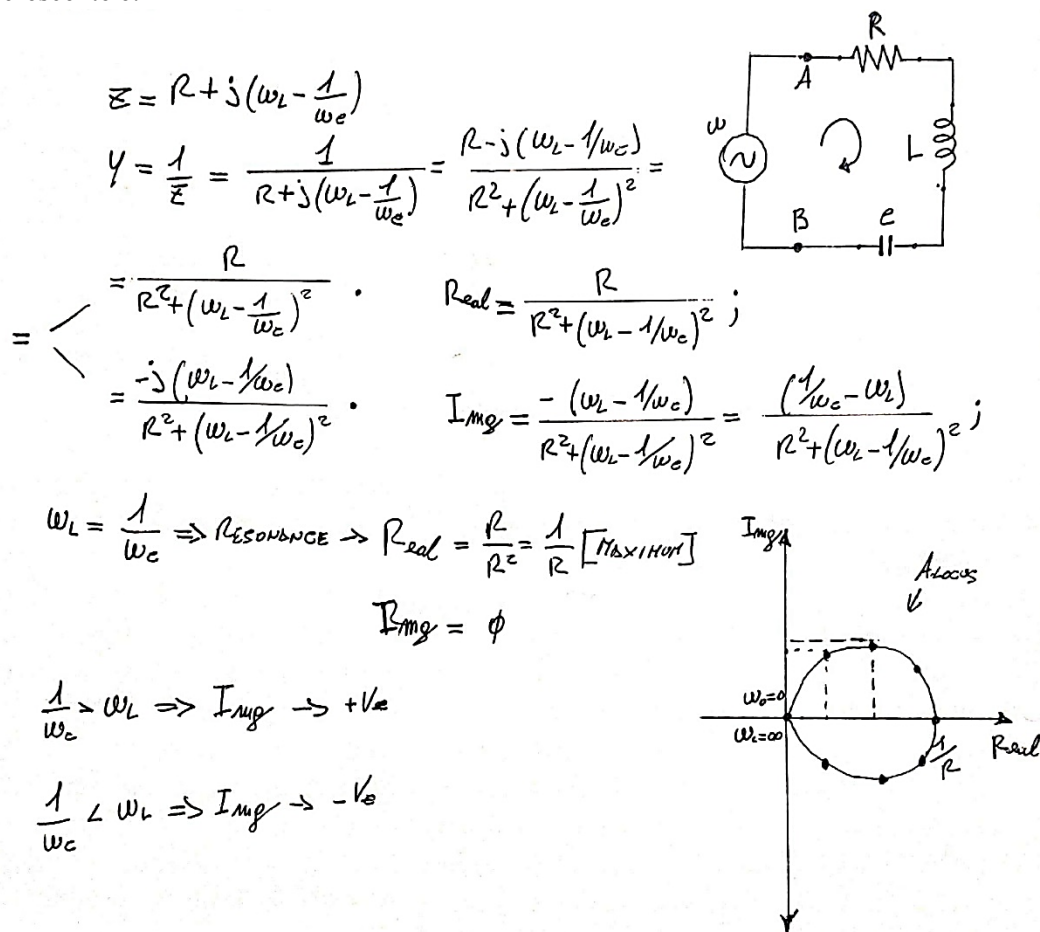


Figura 3-5: Diagramma di ammettenza locus di un circuito RLC seriale

Per un approccio algebrico più accurato, i parametri del circuito equivalente vengono calcolati in base alle caratteristiche dello spettro di immittanza, cioè i parametri numerici come i minimi, i massimi, i punti di inflessione, ecc. sono analizzati e utilizzati per il calcolo dei parametri del circuito equivalente. Per i circuiti equivalenti più semplici e diffusi, vengono analizzate le loro immittanze, i diagrammi di Nyquist e le soluzioni del metodo algebrico come in figura 3.6

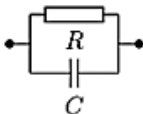
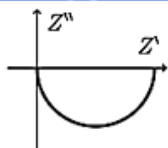
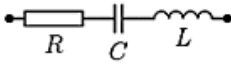
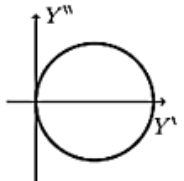
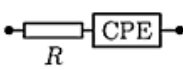
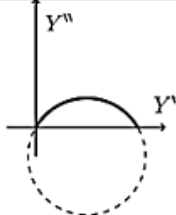
Circuito	Immittenza	Nyquist Plot	Metodo Algebrico
Parallel RC 	$Y = i\omega C + \frac{1}{R}$		$R = -2Z''(\omega_{\min}),$ $C = -\frac{1}{Z''(\omega_{\min})\omega_{\min}}.$
Serial RLC 	$Z = R + \frac{1}{i\omega C} + i\omega L$		$R = Z(f_{\min}) ,$ $L = \frac{Rf_{\max}}{2\pi(f_{\min}^2 - f_{\max}^2)},$ $C = \frac{1}{L(2\pi f_{\min})^2}.$
Serial R-CPE 	$Z = R + \frac{1}{W(i\omega)^\alpha}$		$R = \frac{1}{2Y'(\omega_{\max})},$ $\alpha = \frac{4}{\pi} \arctan[2RY''(\omega_{\max})],$ $W = \frac{1}{R\omega_{\max}^\alpha}.$

Figura 3-6: Circuiti equivalenti ampiamente utilizzati e relative immittanze.

Per questo motivo, il metodo che rientra nel piano complesso, viene solitamente applicato per l'analisi dello spettro EIS. L'idea chiave del protocollo rientra in un particolare costruito matematico. L'ammettenza nell'equazione del costruito matematico può essere sostituita dall'impedenza, dalla grandezza dell'impedenza o da qualsiasi altra funzione di immittanza. Si può anche aggiungere una particolare funzione espressa nel costruito matematico se una certa gamma di frequenze ha un'importanza maggiore di altre. Dal costruito matematico si possono customizzare numerosi algoritmi di ottimizzazione che possono utilizzare i risultati dell'approssimazione del metodo algebrico.

3.2 I modelli di immittanza nella bioelettronica

Il concetto di circuito equivalente (CE) sopra descritto apre una delle vie più fruttuose per lo studio dei sistemi biologici. In particolare, per il contatto tra l'elettrodo metallico, l'elettrolita inerente il mezzo fisiologico e la materia biologica delle cellule, tessuti e

macromolecole. L'elemento chiave presente nella maggior parte di questi dispositivi basati sulla bioimpedenza è rappresentato dalla possibilità di costruire un CE relativamente semplice, che rifletta in modo corretto la sostanza fisica, la sostanza chimica inorganica e organica dei fenomeni fisici, chimici e biologici in tale interfaccia. In questo paragrafo verrà descritto il CE e ne dimostreremo i vantaggi per la ricerca sulle cellule. Al fine di rendere le spiegazioni coerenti, considereremo innanzitutto un modello di interfaccia metallo/elettrolita che ispirerà la progettazione del dispositivo a bioimpedenza denominato BioFEVI.

3.2.1 Doppio strato elettrico nel circuito EIS

Negli ultimi due secoli, Hermann von Helmholtz e Louis G. Gouy insieme a David L. Chapman rispettivamente in questa sequenza, scoprirono che

1. In assenza di reazioni elettrochimiche nell'interfaccia metallo/elettrolita, denominato doppio strato elettrico (DS), questo mostra un comportamento simile a quello di un condensatore;
2. Esiste uno *Strato di Diffusione* (ℓ_d) è possibile costruire un modello dell'interfaccia metallo/elettrolita.

Per semplicità tratteremo un caso a una dimensione. Consideriamo un elettrodo planare immerso in una soluzione elettrolitica con concentrazione ionica η_0 , permeabilità dielettrica ϵ e temperatura T ; gli ioni nell'elettrolita sono considerati un gas ideale come mostrato nella figura 3.7 e risultano globalmente distribuiti in assenza di una tensione sull'elettrodo.

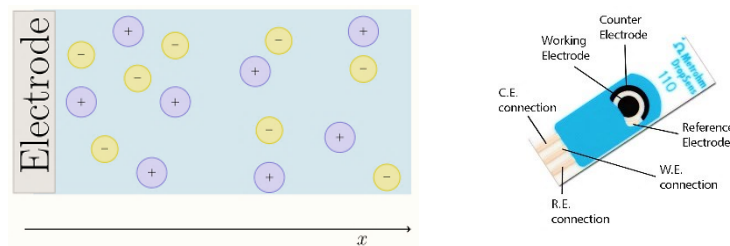


Figura 3-7: Elettrodo ideale 2D a sinistra e ioni dell'elettrolita – Elettrodo SPE reale a destra

Nella figura 3.8 possiamo vedere cosa succede se all'elettrodo viene applicata la tensione V_0 . Secondo l'equazione di Poisson, la distribuzione del potenziale elettrico nell'elettrolita può essere descritta come

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \phi(x) = - \frac{4\pi}{\epsilon} \rho(x) \quad (19)$$

dove x è la coordinata in direzione perpendicolare all'elettrodo e $\rho(x)$ è la densità di carica formata dagli ioni. Inoltre, la distribuzione della concentrazione di ioni deve soddisfare la statistica di Boltzmann, ovvero la distribuzione degli ioni con carica positiva è uguale a

$$\eta_+(x) = \eta_0 e^{-\bar{e}\phi(x)/kT} \quad (20)$$

e la distribuzione degli ioni carichi negativamente è pari a

$$\eta_-(x) = \eta_0 e^{+\bar{e}\phi(x)/kT} \quad (21)$$

dove e è la carica dell'elettrone. Qui e in seguito, per semplicità, considereremo solo le cariche singolari. La densità di carica totale è uguale a

$$\rho(x) = \bar{e}\eta_+(x) - \bar{e}\eta_-(x) \quad (22)$$

La distribuzione degli ioni dopo aver applicato una tensione negativa all'elettrodo forma lo strato di Helmholtz (HL) e lo strato di Gouy-Chapman (strato di diffusione). Per basse tensioni dell'elettrodo, nello strato di Gouy-Chapman sulla distanza ℓ_d (lunghezza di schermatura di Debye) la concentrazione non uniforme degli ioni cade in $e = 2,71828...$ volte. Si noti che lo strato di Helmholtz potrebbe essere come più strati di ioni e molecole di solvente.

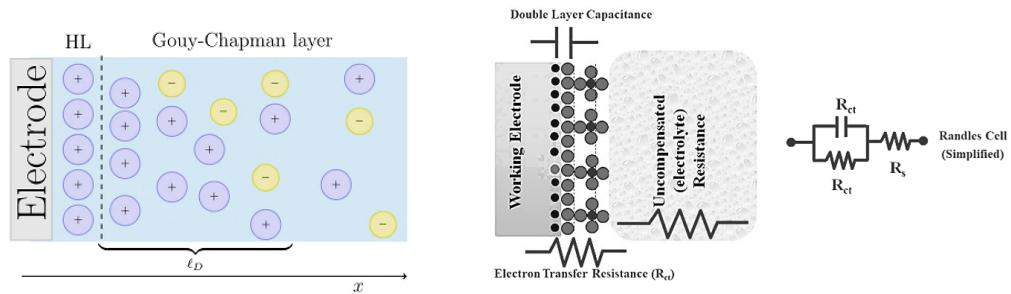


Figura 3-8: Schema per il problema di Gouy-Chapman-Stern e Schema circuito equivalente reale con W. electrode

Combinando le equazioni (19), (20), (21) e (22) si ottiene l'equazione per il potenziale

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \phi(x) = \frac{8\pi\bar{e}}{\epsilon} \eta_0 \sinh \frac{\bar{e}\phi(x)}{kT} \quad (23)$$

Per risolvere questa equazione, consideriamo il caso $\bar{e}\phi \ll kT$ questa è l'approssimazione di Debye ed espandere il lato destro dell'equazione (23) nella serie di Taylor. Come risultato, nell'approssimazione di Debye, la distribuzione del potenziale può essere scritta come

$$\phi = \phi_0 e^{-x/\ell_D} \quad (24)$$

$$\ell_D = \sqrt{\frac{\epsilon kT}{8\pi\bar{e}^2\eta_0}} \quad (25)$$

è la lunghezza di schermatura di Debye (qui abbiamo assunto che $\varphi(\infty) = 0$). Ad esempio, nella soluzione fisiologica (0,9% NaCl) $\ell_d = 8 \text{ \AA}$. Ora la capacità dell'elettrodo può essere facilmente calcolata come rapporto carica-tensione

$$C = \frac{Q}{V_0} = \frac{\int_0^\infty \rho dx}{V_0} S = \frac{\epsilon \varphi'(x)|_0^\infty}{4\pi V_0} S = \frac{\epsilon S}{4\pi \ell_D} \quad (26)$$

dove Q è la carica totale dell'elettrodo, S è l'area dell'elettrodo. Vale la pena di notare che l'equazione (26) è simile all'equazione che descrive la capacità del condensatore a piastre parallele con la permeabilità dielettrica ϵ e la distanza tra le piastre ℓ_d . La verifica dell'equazione (26) con i dati sperimentali ha rivelato che questo modello sovrastima il valore della capacità sperimentale. Per ottenere risultati più precisi, Gouy e Chapman hanno trovato la soluzione esatta dell'equazione monodimensionale (23) e l'hanno utilizzata per ricavare la capacità differenziale dell'interfaccia metallo/elettrolita che corrisponde alla capacità di

$$C_{GC} = \frac{\epsilon S}{4\pi \ell_D} \cdot \coth \frac{\bar{e} V_0}{2kT} \quad (27)$$

approssimazione di Debye per $\bar{e} V_0 \ll 2kT$ l'equazione (23) può essere facilmente integrata moltiplicandola per $2\varphi(x)$. Purtroppo, già per valori relativamente piccoli di tensione applicata all'elettrodo, la capacità di Gouy-Chapman diventa troppo grande e perde di significato fisico.

Questo paradosso deriva dal fatto che il modello di gas ideale per gli ioni nell'elettrolita non è valido se si applica una tensione elevata all'elettrodo. Infatti, dalle equazioni (20) e (21) è facile vedere che la densità degli ioni all'elettrodo è uguale a

$$\eta(0) = \eta_+(0) + \eta_-(0) = 2\eta_0 \coth \left(\frac{\bar{e} V_0}{kT} \right) \quad (28)$$

D'altra parte, possiamo stimare la densità massima degli ioni come

$$\eta_{\max} \approx \frac{1}{\text{Volume di un'ione}} = \frac{3}{4\pi r^3} \quad (28)$$

dove r è il raggio effettivo dello ione. Da queste equazioni, è chiaro che per la soluzione NaCl 0,9% a temperatura ambiente, la densità di ioni sodio all'elettrodo $\eta(0)$ diventa maggiore della densità massima di ioni sodio $\eta_{\max}$ quando la tensione dell'elettrodo è diventata -0,15 V in questo caso abbiamo usato il valore 0,18 nm per il raggio dello ione sodio (Francisco, et. al., 1997). Una stima simile potrebbe essere plausibile se prendiamo come $\eta_{\max} = 8/(5,65 \text{ \AA})^3$ la "concentrazione" degli ioni nel cristallo NaCl (il rapporto tra il numero di atomi per cella reticolare e il volume della cella reticolare). Inoltre, il raggio degli ioni (Francisco, et. al., 1997) e il parametro reticolare del cristallo NaCl (5,65 Å) in questo sistema di esempio sono

paragonabili alla lunghezza di schermatura di Debye, quindi la distribuzione del potenziale (24) e la conseguente densità degli ioni diventano vagamente applicabili per $x = 0$. Per questo motivo è impossibile considerare gli ioni come oggetti puntiformi sulla superficie dell'elettrodo e ad alte tensioni.

Per questo motivo, gli ioni non possono avvicinarsi in modo arbitrario all'elettrodo, ma formano un cosiddetto strato di Helmholtz o piano di massimo avvicinamento sulla sua superficie. Ciononostante, a distanze relativamente grandi dall'elettrodo (qualche ℓ_d) la distribuzione degli ioni può essere descritta correttamente dall'approssimazione di Debye.

Questi effetti sono stati presi in considerazione da Otto Stern nel '24, che ha proposto la struttura a due regioni per il metallo/elettrodo (Piersma, et. al., 1966), (Jinhee, et. al., 2014). In questo modello, si ipotizza che gli ioni formano sia lo strato di Helmholtz sia il più distante strato di Gouy-Chapman, che è anche chiamato strato di diffusione come in figura 3.8.

Il doppio strato elettrico nella teoria di Gouy-Chapman-Stern può essere descritto dal circuito equivalente che contiene una connessione seriale della capacità dello strato di Helmholtz e della capacità di Gouy-Chapman-Stern. A causa del fatto che il valore della capacità di Helmholtz è solitamente significativa ad alte concentrazioni di ioni sarà molto più basso del valore della capacità di Gouy-Chapman, la capacità dell'interfaccia metallo/elettrolita è determinata dalla capacità di Helmholtz. Tipicamente la capacità dello strato di Helmholtz è definita come

$$C_H = S \times c_u, \quad (29)$$

dove S è l'area e c_u è la capacità per unità di area ottenuta sperimentalmente. Pertanto, l'immittanza totale dell'interfaccia metallo-elettrolita può essere rappresentata da un circuito seriale RC

$$Z_{ME} = R_b + \frac{1}{i\omega C_{dl}}, \quad (30)$$

dove R_b è la resistenza di massa dell'elettrolita e $C_{dl} = C_H || C_{GC}$ è la capacità di doppio strato. Strato che verrà esplicitata di seguito nel sotto paragrafo 3.2.2.

3.2.2 Dispersione della capacità del doppio strato

Se pur vero che la teoria di Gouy-Chapman-Stern risulta completamente coerente, la dipendenza dalla frequenza dell'immittanza metallo/elettrolita descritta dall'Equazione 30 è raramente osservabile a causa dell'effetto della cosiddetta dispersione di capacità. Questo fenomeno prevede che invece di un comportamento simile a quello di un condensatore l'immittanza dell'interfaccia metallo/elettrolita è regolata dalla seguente equazione

$$Z_{m/e} = R_b + \frac{1}{W(i\omega)^\alpha} \quad (31)$$

dove R_b è ancora la resistenza di massa dell'elettrolita, α è il cosiddetto parametro di non idealità e W è la pseudo-capacità con dimensione $\Omega^{-1} H_z^{-\alpha} = S_s^\alpha$. L'elemento con impedenza $1/W(i\omega)^\alpha$ è direttamente riferito alla dispersione di capacità e chiamato elemento a fase costante (CPE), perché la sua impedenza di fase $\pi\alpha/2$ è indipendente dalla frequenza (per le proprietà del CPE si veda la figura 3.6). Nonostante siano stati dedicati numerosi lavori sperimentali e teorici all'argomento, la vera origine della dispersione di capacità non è ancora stata chiarita. Tuttavia, esistono due tipi di modelli utili ed esemplificativi che spiegano parzialmente questo fenomeno. I modelli del primo tipo si basano sulla diffusione e sugli effetti chimici, mentre i modelli del secondo tipo spiegano la capacità di dispersione attraverso la non uniformità spaziale del flusso di corrente attraverso un elettrodo. In questa dissertazione illustreremo i due esempi più noti di tali modelli, uno per ciascun tipo.

Il primo esempio è il modello proposto da E. Warburg e cioè la cosiddetta impedenza di Warburg. Il modello può essere introdotto come segue: supponiamo che, dopo aver dato tensione all'elettrodo, si generi una concentrazione di ioni non in equilibrio sulla sua superficie. Ad esempio, questa concentrazione di non-equilibrio può derivare dalle reazioni elettrochimiche tra gli ioni dell'elettrolita e gli atomi dell'elettrodo. Poiché gli ioni formano una concentrazione non uniforme $\eta(x, t)$, si verifica anche un flusso di diffusione di ioni la così detta corrente di diffusione che in questo modello, se la lunghezza di Debye è piccola e il campo elettrico nell'elettrolita è debole, possiamo trascurare la corrente elettrica di deriva.

Quindi l'ipotesi che la concentrazione di ioni sulla superficie dell'elettrodo (in corrispondenza di $x = 0$) è proporzionale all'entità della tensione applicata V_0 , cioè $\eta|_{x=0} = \gamma V_0$ è realizzato. Quindi, nel caso di una distribuzione unidimensionale di ioni e di una tensione di eccitazione armonica $V_0 := V_0 e^{i\omega t}$ si può scrivere la seguente serie di equazioni che si basano sulla diffusione.

$$\begin{cases} D \frac{\partial^2 \eta(x,t)}{\partial x^2} = \frac{\partial \eta(x,t)}{\partial t} \\ \eta(x,t) \Big|_{x=0} = V_0 e^{i\omega t} \\ \eta(x,t) \Big|_{x=\infty} = \phi \end{cases} \quad (32)$$

dove D è il coefficiente di diffusione. Dopo aver risolto questo sistema, si ottiene l'espressione (33) per la concentrazione di ioni e infine, per ricavare l'immittanza di Warburg si deve utilizzare la legge di Fick per calcolare la corrente attraverso l'elettrodo (a $x = 0$) e metterla in relazione con la tensione di eccitazione V_0 ,

$$\eta(x,t) = V_0 e^{-\sqrt{i\omega/D}x} e^{i\omega t} \quad (33)$$

Come risultato, otteniamo

$$Y_w = \frac{-\bar{L} D \eta'(x=0) e^{i\omega t}}{V_0 e^{i\omega t}} = \bar{L} \gamma \sqrt{i\omega} \quad (34)$$

oppure

$$Z_w = \frac{1}{\bar{L} \gamma \sqrt{D} \cdot (i\omega)^{1/2}} \quad (35)$$

Dall'equazione (35) si può notare che tenendo conto degli effetti di diffusione si ottiene una dispersione di capacità con il parametro di non idealità $\alpha = 1/2$.

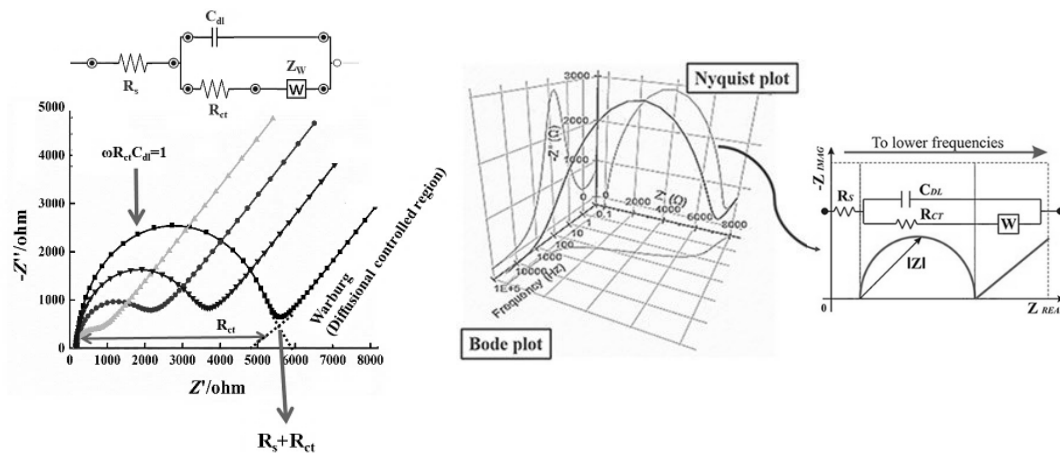


Figura 3-9: Spettri d'impedenza sperimentali e simulati che mostrano un circuito equivalente di Randles semplificato per un sistema elettrochimico e Z_w di Warburg.

Il secondo esempio da prendere in considerazione è il modello di R. Levie di un elettrodo con una scanalatura sulla superficie. Per semplicità, trattiamo il caso limite del modello di

Levie, quando la scanalatura ha profondità infinita e degenera nel poro come mostrato in figura 3.10(a), la direzione da destra a sinistra corrisponde alla profondità del poro lungo l'asse centrale. Per calcolare l'impedenza di questo sistema, si può utilizzare la cosiddetta approssimazione a linea di trasmissione. Dividiamo il poro lungo il suo asse di simmetria in parti infinite con lunghezza infinitesima, vedi figura 3.10. Da quanto stabilito si può notare che la corrente J_n che attraversa la resistenza della sezione trasversale della sezione n -esima è formata dalla somma della corrente J_{n-1} nella $(n - 1)$ -esima sezione e della corrente $J_n^\perp$ che attraversa l'impedenza metallo/elettrolita che assumiamo essere capacitiva. La corrente che fluisce attraverso la sezione n -esima si aggiunge all'analogo corrente J_{n+1} che fluisce attraverso la resistenza della $(n + 1)$ -esima sezione, e così via ($J_{n+1} = J_n + J_{n+1}^\perp$, $J_{n+2} = J_{n+1} + J_{n+2}^\perp$, ecc.) Pertanto, nell'approssimazione della linea di trasmissione, un poro può essere modellato come un circuito RC a scala infinita, la cui impedenza Z_L può essere facilmente calcolata.

In effetti, basti notare che il valore di Z_L non cambia se si collega un altro ramo RC al circuito, Figura 3.10(b),

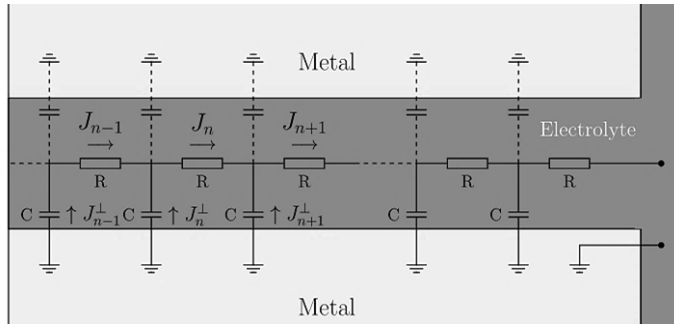


Figura 3-10: Sul problema di Levie - Schema 2D poro dell'elettrodo (a)

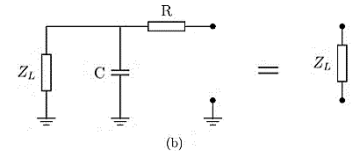


Figura 3-11 Impedenza totale del poro (b)

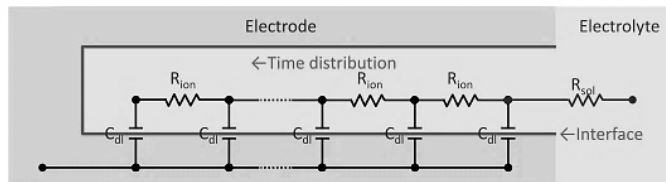


Figura 3-12: Rappresentazione schematica processi non-faradici su elettrodo planare

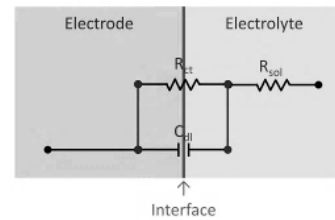


Figura 3-13: Processo faradico su elettrodo planare

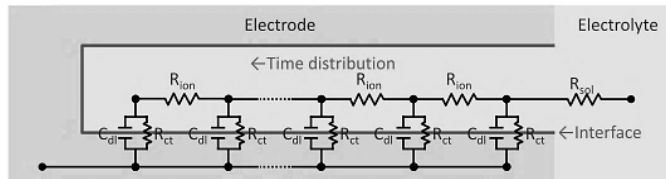


Figura 3-14: Rappresentazione schematica processi faradici su elettrodo planare

(Nota fig. 3.10., sul problema di Levie: (a) Un poro infinito nell'elettrodo può essere rappresentato come un circuito RC a scala infinita. In questo caso, la tensione è applicata al metallo e alla parte destra dell'elettrolita. La direzione dalla superficie dell'elettrodo nella profondità del poro è da destra a sinistra. (b) L'impedenza di tale poro Z_L può essere facilmente calcolata, se si osserva che essa non cambia dopo aver collegato un altro ramo RC)

$$Z_L = R + Z_L \parallel \frac{1}{i\omega C} \quad (36)$$

dove la designazione $\parallel$ simboleggia l'impedenza dei due elementi in parallelo e quindi

$$Z_L = \frac{R}{2} \left(1 + \sqrt{1 + \frac{4}{i\omega RC}} \right) \quad (37)$$

è facile notare che nel limite di frequenza ultra basso l'equazione (37) può essere scritta come

$$Z_L = \sqrt{\frac{R}{i\omega C}} \quad (38)$$

e ancora una volta osserviamo la dispersione della capacità con $\alpha = 1/2$.

3.2.3 Interfaccia metallo/elettrolita/cellula.

Ad oggi, esiste un gran numero di modelli che descrivono le proprietà elettriche dell'interfaccia metallo/elettrolita/cellula (MCE): un elettrodo che trasporta la popolazione cellulare o una singola cellula sulla sua superficie (Bagnaninchi, et. al., 2011), (Amini, et. al., 2018) (Plunger, et. al., 2012). Uno dei circuiti equivalenti qualitativi più popolari per l'interfaccia metallo/elettrolita/cellula è il modello ECIS proposto da I. Giaever e C. Keese. Per comprendere meglio la sua origine, la Tabella 3.1 elenca le proprietà più significative del contatto MEC. Dai dati riportati in questa tabella, si può notare che la cellula stessa è un dielettrico molto forte di fatto a basse frequenze l'impedenza della cellula è superiore all'impedenza dell'interfaccia metallo-elettrolita puro. Questo aspetto è dovuto alla composizione lipidica della membrana e ai canali ionici molto selettivi sotto forma di proteine. Quindi, di fatto, si può trascurare la corrente attraverso la cellula a basse frequenze. Allo stesso tempo, possiamo notare che le cellule sono connesse alla superficie dell'elettrodo tramite i cosiddetti contatti focali, cioè la maggior parte della membrana cellulare non ha un contatto diretto con la superficie dell'elettrodo. Pertanto, tra membrana cellulare e la superficie dell'elettrodo esiste un legame effettivo. Il modello Giaever-Keese si basa su questa affermazione. Per superare l'interfaccia metallo/elettrolita/cellula la corrente deve superare l'impedenza elettrochimica $Z_{m/e}$ rif. equazione (3), figura 3.15 in assenza di cellula, e anche la

resistenza del legame effettivo tra la cellula e la superficie dell'elettrodo, parte centrale in figura 3.15 (b, c). Questo fenomeno può essere descritto con una resistenza attiva seriale R_s nel sistema metallo/elettrolita/cella.

$$Z_{HEC} = Z_{M/R} + R_s \quad (39)$$

Va notato che la resistenza aggiuntiva R_s ha una natura geometrica perché gli ioni portatori di corrente a basse frequenze non possono penetrare nella cellula e dovrebbero scorrere lungo la membrana cellulare seguendo la sua forma. Per quanto Z_{MEC} dipenda dalle proprietà elettriche e morfologiche di una cellula, il suo valore può essere utilizzato per la caratterizzazione funzionale delle cellule. Ad esempio, se le cellule vengono danneggiate da tossine o radiazioni, si verifica una distorsione della membrana cellulare.

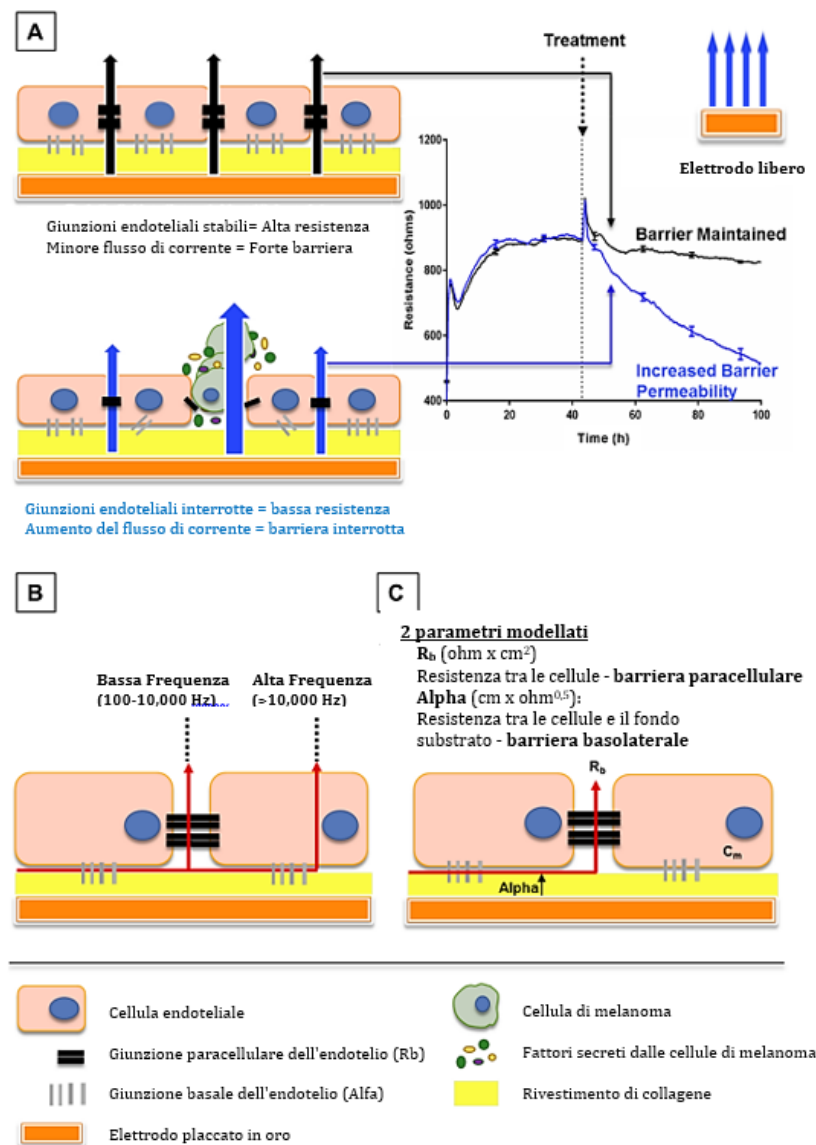


Figura 3-15: Schema che spiega la teoria del rilevamento dell'impedenza elettrica cellula-substrato (ECIS).

(Nota Fig. 3.15., sulla teoria del rilevamento dell'impedenza elettrica cellula-substrato (ECIS): (A) Questo mostra le cellule endoteliali che crescono su elettrodi d'oro rivestiti di collagene di coda di ratto. Le cellule endoteliali formano un monostrato formando giunzioni tra loro e con il substrato di collagene, indicate rispettivamente dalle barre nere e grigie. Una volta formate queste giunzioni, la corrente fornita dall'elettrodo diminuisce, attraverso le giunzioni cellulari. Questo aumenta la resistenza elettrica, come si vede nel grafico (a destra). Quando le cellule diventano confluenti, si raggiunge la massima resistenza e la resistenza si stabilizza. Con il trattamento con fattori che interrompono la barriera endoteliale, le giunzioni si indeboliscono, la corrente fluisce più liberamente tra le cellule e la resistenza elettrica diminuisce (traccia blu, a destra). (B) Questo mostra come i dati ECIS possano essere modellati in base alla frequenza con cui la corrente viene applicata dagli elettrodi. A basse frequenze (100-10.000 Hz), la corrente fluisce solo tra le cellule, mentre ad alte frequenze (>10.000 Hz), la corrente può fluire anche attraverso le cellule. (C) Collettivamente, i dati a bassa e alta frequenza possono essere modellati per fornire informazioni sulla resistenza tra le cellule (R_b) e sulla resistenza tra le cellule e il substrato sottostante (Alfa)).

Questo provoca una diminuzione di R_s e un aumento della corrente attraverso l'interfaccia metallo/elettrolita/cellula come mostrato in figura 3.15. In questo caso, si osserva un'alterazione di $Z_{MEC} \approx Z_{m/e}$, che potrebbe essere utilizzata per la stima della vitalità delle cellule mediante l'impiego di biosensori non ottici e label-free. Sempre nell'ambito del modello di Giaever-Keese, l'EIS dell'interfaccia metallo/elettrolita/cellula può essere utilizzata per studiare la motilità cellulare, per studiare le interazioni tra le cellule, in farmacologia e nella ricerca sulla guarigione delle ferite, nella biosensoristica e persino come strumento diagnostico nei dispositivi di protesi visiva.

Tabella 3-1: Test BioFEVI - Proprietà elettriche di cellule e bioelettrodi

Quantità	Valore
Permeabilità dielettrica della membrana	3
Spessore della membrana cellulare	75 Å
Capacità della membrana cellulare per unità di superficie	$\sim 100 \text{ nF/cm}^2$, $0,95 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$
Capacità dell'intera membrana cellulare per una cellula di 30 μm	$\sim 1 \text{ pF}$
Conducibilità elettrica del citoplasma	$220 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
Resistenza del canale ionico	$10 \text{ G}\Omega$
Resistenza del mezzo fisiologico	$50 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
Resistenza tipica dell'elettrolita di massa per un elettrodo di 30 μm	$50 \text{ k}\Omega$
Capacità DL (300 K, 0,9% NaCl, 10 mV)	$0.8 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$, Eq.

3.3 Dalle teorie e tecniche sperimentali di spettroscopia di impedenza alla ideazione del dispositivo BioFEVI

L'ampia gamma di applicazioni EIS ha portato alla comparsa di un gran numero di metodi e dispositivi per la misurazione dell'immittanza, che possono essere suddivisi in approcci nel

dominio della frequenza e approcci nel dominio del tempo. Per illustrare questa classificazione consideriamo lo schema più comune per la misurazione dell'immittanza, rappresentato nella figura 3.1. I metodi del dominio della frequenza utilizzano una tensione di eccitazione sinusoidale a una singola frequenza figura 3.16(a), e l'immittanza viene misurata in modo graduale frequenza per frequenza.

I vantaggi degli approcci nel dominio della frequenza includono l'elevata immunità al rumore e la semplicità dei setup sperimentali. Tuttavia, uno svantaggio fondamentale di questi approcci è una frequenza di misura molto bassa.

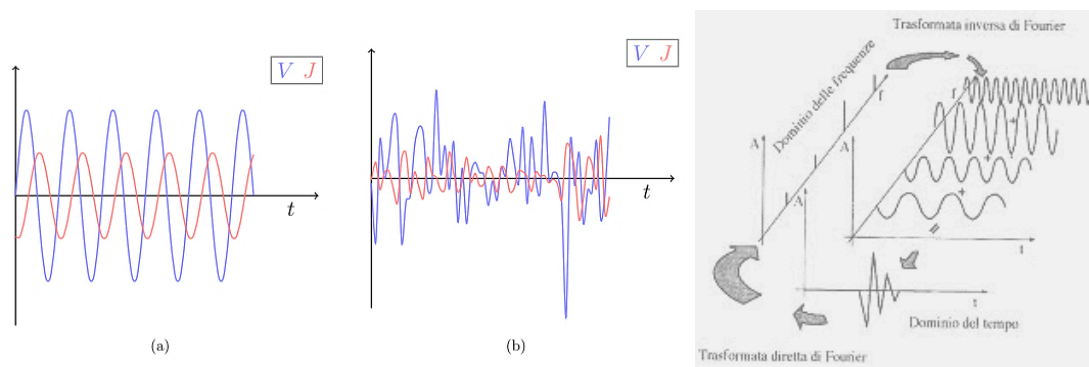


Figura 3-16: Confronto delle forme d'onda della tensione e della corrente di eccitazione tra l'approccio nel dominio della frequenza (a) e l'approccio nel dominio del tempo (b)

Nei metodi del dominio del tempo, il campione viene scansionato contemporaneamente a tutte le frequenze da un'ampia regione di frequenza di interesse utilizzando TE con un ampio spettro. Una tipica forma d'onda per i metodi nel dominio del tempo è presentata nella Figura 3.16(b). Questa strategia riduce drasticamente il tempo necessario per una singola misura di immittanza. Tuttavia, metodi classici nel dominio del tempo, basati sulla trasformata di Fourier, dimostrano una scarsa immunità al rumore molto bassa. La combinazione di alta velocità di misura e alta immunità al rumore può essere ottenuta utilizzando l'EIS con filtraggio adattivo.

Di seguito verranno prese in considerazione le implementazioni sperimentali EIS più comunemente utilizzate. Da notare che per tutti gli approcci di misurazione dell'immittanza discussi, la TE può essere registrata direttamente dal convertitore analogico-digitale (ADC), mentre la risposta in corrente può essere registrata utilizzando l'ADC e l'amperometro, secondo lo schema illustrato in figura 3.17.

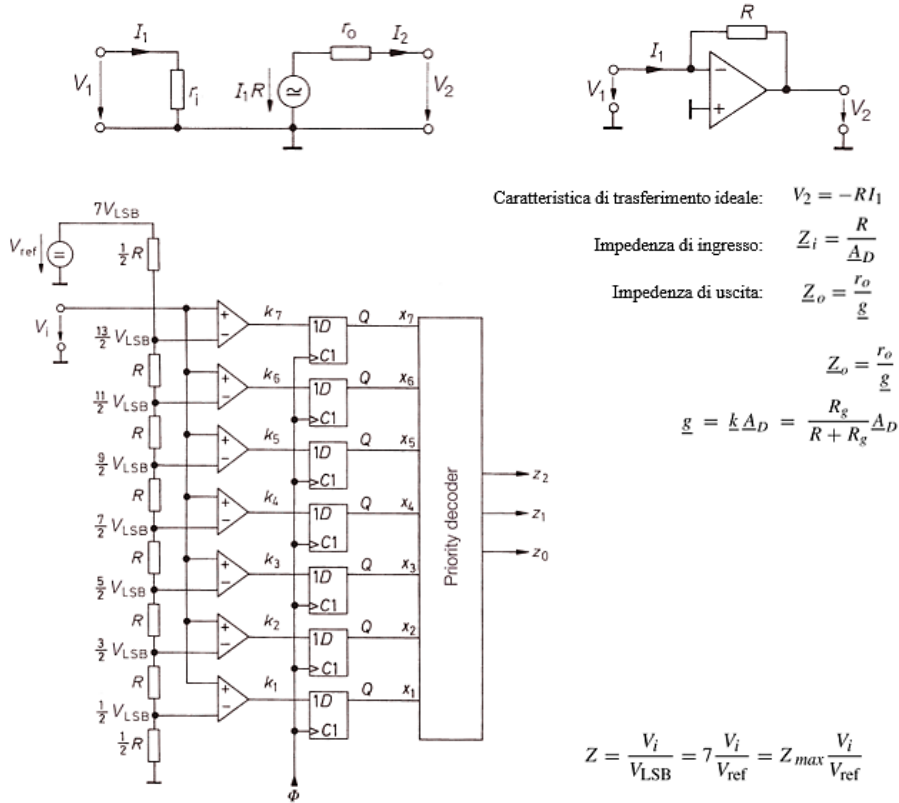


Figura 3-17: Sorgenti di tensione a controllo di corrente – Convertitore parallelo ADC

3.3.1 Approcci nel dominio della frequenza.

- *Approccio all'oscilloscopico.* Il modo più semplice per determinare l'immittanza nel dominio della frequenza è quello di utilizzare un oscilloscopio a due canali con un canale collegato a un voltmetro e un altro canale collegato a un'uscita amperometrica, vedi figura 3.1. I dati tipicamente osservati con l'approccio oscilloscopico sono presentati nella figura 3.16 (a). Di conseguenza, l'ampiezza dell'impedenza può essere ricavata dal rapporto tra l'ampiezza della tensione e l'ampiezza della corrente, mentre la fase dell'impedenza può essere ricavata dallo sfasamento tra tensione e corrente, rif. equazione (14). I vantaggi dell'approccio oscilloscopico sono la semplicità e la visualizzazione geometrica, gli svantaggi sono una precisione molto bassa e l'instabilità ai rumori. L'approccio oscilloscopico potrebbe essere utilizzato in studi preliminari di bio-EIS come di fatto nello sviluppo del dispositivo BioFEVI.

3.3.2 Metodi del dominio del tempo

- *Metodo Fourier EIS e limitazioni.* In precedenza abbiamo detto che lo svantaggio principale dei metodi nel dominio della frequenza è la bassa velocità di misurazione. Ad esempio, sono necessari almeno 10 secondi per misurare l'impedenza nell'intervallo di frequenza da 1 Hz a 40 kHz con una risoluzione di 1 Hz. Questo problema della bassa velocità di misura è stato risolto nel '92 da G. Popkirov, che propose di scansionare il campione simultaneamente in un'ampia gamma di frequenze applicando una tensione di eccitazione ad ampio spettro e di utilizzare la trasformata di Fourier per estrarre l'immittanza del campione dalle sequenze misurate nel dominio del tempo della risposta TE e della corrente. Una tipica forma d'onda di TE per questo approccio è rappresentata nella figura 3.16 (b). In altre parole, l'immittanza del campione può essere derivata come relazione tra le immagini di Fourier delle risposte di tensione di eccitazione e delle risposte di corrente.

L'idea di Fourier EIS si ispira all'equazione (16). In pratica, si utilizza una discreta di Fourier piuttosto che una trasformazione continua, perché la tensione di eccitazione e la risposta di corrente sono registrate con un convertitore analogico-digitale e memorizzate nella memoria del computer come sequenze discrete V_k e J_k di valori di tensione e corrente di eccitazione e della risposta di corrente (k è il contatore temporale). In questo modo, poiché qualsiasi sequenza periodica può essere espansa in serie di Fourier discrete, l'immittanza sulla frequenza f_m può essere calcolata come

$$Z_m = \frac{\tilde{V}_m}{\tilde{J}_m}, \quad Y_m = \frac{\tilde{J}_m}{\tilde{V}_m} \quad (40)$$

dove

$$\tilde{V}_m = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} V_k e^{2\pi i f_m \cdot k(T/N)} \quad (41)$$

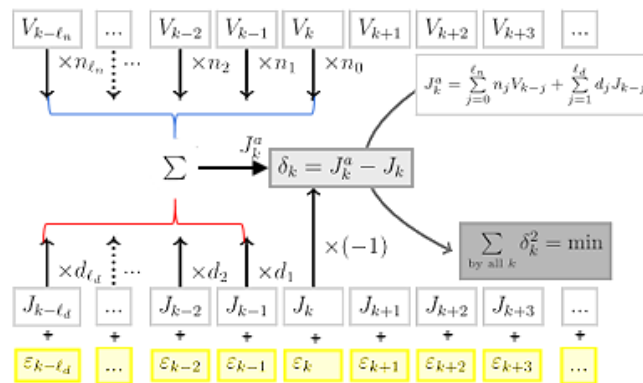
$$\tilde{J}_m = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} J_k e^{2\pi i f_m \cdot k(T/N)} \quad (42)$$

sono immagini discrete di Fourier della tensione di eccitazione e della risposta in corrente rispettivamente, N è la lunghezza delle sequenze di tensione di eccitazione e di risposta di corrente registrate, T è la durata della misura, $f_m = m/T$ è la frequenza armonica discreta di Fourier ($m \in \mathbb{Z}$, $0 \leq m \leq N$). Di conseguenza, la risoluzione del metodo Fourier EIS è $1/T$.

È ovvio che la velocità di misura minima richiesta per l'EIS di Fourier è limitata dal periodo dell'armonica di frequenza più bassa della tensione di eccitazione. Quindi, per l'esempio sopra

citato, con Fourier EIS sarà necessario 1 secondo per misurare l'impedenza nell'intervallo di frequenza da 1 Hz a 40 kHz con una risoluzione di 1 Hz, cioè nel dominio del tempo. L'EIS di Fourier potrebbe essere più veloce rispetto ai metodi nel dominio della frequenza. Va notato che l'EIS di Fourier è più efficiente nel caso in cui $N = 2^d$, $d \in \mathbb{N}$, perché in questo caso è possibile utilizzare algoritmi veloci di trasformazione di Fourier che accelerano notevolmente i calcoli delle immagini di Fourier (41) e (42). Ad oggi la trasformata di Fourier EIS è utilizzata per studiare i processi veloci nelle cellule.

- *Metodo EIS basato sul filtraggio adattivo.* Purtroppo, un'elevata frequenza di misurazione di Fourier EIS è in diretta contraddizione con una tecnica classica di rimozione del rumore che esegue l'accumulo e la media del segnale. Pertanto, se un apparato di rimozione del rumore, come la schermatura, la diminuzione della temperatura, la variazione della geometria degli elettrodi, ecc. sono insufficienti, cosa che avviene spesso nelle bio-applicazioni, allora la risposta di corrente e quindi lo spettro di immittanza Fourier EIS saranno drammaticamente con segnali di rumore. In rari casi questo problema può essere parzialmente risolto con un metodo BioFEVI-CNLMQ. Tuttavia, nella maggior parte dei casi il metodo BioFEVI-CNLMQ non è immune al rumore e può essere molto sensibile alla distorsione dello spettro sperimentale fornito in ingresso. Quindi, per preservare l'alta velocità di misurazione conservando l'immunità al rumore, verrà implementato il sistema EIS adattivo a filtraggio BioFEVI-EISDAC-AF. L'idea chiave del EISDAC-AF è che la risposta della corrente e la tensione di eccitazione non sono indipendenti, come nel caso dell'EIS di Fourier, e sono correlate tra loro tramite un'equazione lineare con finite differenze. In altre parole, la risposta di corrente si forma elaborando la tensione di eccitazione con un filtro digitale. Quindi, se indoviniamo quale filtro converte la tensione di eccitazione nella risposta di corrente, possiamo facilmente individuare la sua *funzione di trasferimento*, che è ovviamente uguale all'ammettenza del campione. Questo problema è noto come il problema dell'identificazione di un sistema lineare o dell'identificazione di una black box. Un potente strumento per



risolvere questo problema è la tecnica del filtraggio adattivo. Dal punto di vista matematico questo problema può essere formulato come in figura 3.18.

(Nota Fig. 3.18., Ad ogni passo k , il filtro adattivo, il filtro adattivo prende diversi valori precedenti delle risposte della tensione e della corrente di eccitazione del campione sconosciuto, li moltiplica per i coefficienti di peso, somma il risultato e modifica i coefficienti di peso in modo tale da minimizzare la differenza tra la filtrazione adattativa previsione J_k^a e la risposta attuale J_k ottenuta sperimentalmente. Dopo questa procedura, la funzione di trasferimento del filtro adattivo sarà l'approssimazione priva di rumore dell'ammettenza del campione.)

Date le sequenze V_k e J_k , occorre costruire un filtro

$$J_k^a = \sum_{j=0}^{\ell_n} n_j V_{k-j} + \sum_{j=1}^{\ell_d} d_j J_{k-j} \quad (43)$$

che minimizzi lo spettro di immittanza funzionale

$$\sum_{\text{per tutti } k} |J_k - J_k^a|^2 \approx \text{min.} \quad (44)$$

$$\hat{Y} \approx \left(\sum_{j=0}^{\ell_n} n_j \phi_j \right) / \left(1 - \sum_{j=1}^{\ell_d} d_j \phi_j \right) \quad (45)$$

Nella equazione (44), J_k^a è la predizione del filtro adattivo, n_j e d_j sono i cosiddetti coefficienti di peso e $\max(\ell_n, \ell_d)$ è l'ordine del filtro. Una volta trovati i coefficienti di peso ottimali e dopo il processo di apprendimento del filtro, con una frequenza di campionamento sufficientemente alta e un tempo di raccolta dati sufficientemente alto, l'ammettenza del campione può essere calcolata semplicemente con la seguente formula dove $\phi_j = \exp[i2\pi(f/f_0)j]$, f è la frequenza e f_0 è la frequenza di campionamento. Effettivamente, l'equazione (45) è l'approssimazione di Levy dell'ammettenza del campione nell'intervallo $[-f_B, f_B]$ (f_B è l'armonica più alta della tensione di eccitazione) con un peso pari al quadrato della grandezza dello spettro della tensione di eccitazione. Il principale vantaggio dell'EISDAC-AF rispetto al Fourier EIS è l'elevata immunità al rumore. È possibile dimostrare che in caso di rumore

$$\text{Errore in } |Y| \leq C \frac{\langle \epsilon^2 \rangle}{\sqrt{\ell_n + \ell_d + 1}} \quad (46)$$

autocorrelato che non è correlato con la tensione di eccitazione e la risposta di corrente, l'errore nei coefficienti di peso e, di conseguenza, l'errore nello spettro di immittanza ottenuto è

dove $\langle \varepsilon^2 \rangle$ è il valore quadratico medio del rumore e C è un moltiplicatore, il cui valore dipende dal condizionamento del problema (44). L'EISDAC-AF potrebbe essere applicabile per la ricerca su singole cellule viventi anche in ambienti ad alto rumore ad esempio rapporto segnale/rumore 3 dB.

3.4 Sintesi delle applicazioni EIS introdotte nel progetto BioFEVI

In questo paragrafo verranno descritte in maniera sintetica alcune delle applicazioni dell'EIS in biologia, medicina, farmacologia e biosensoristica che verranno introdotte nel progetto BioFEVI per quanto concerne la *ricerca su cellule vive, applicazioni mediche, Biomateria e biosensoristica per applicazioni Genomiche e Proteomiche*.

- *Ricerca su cellule vive*: Una delle applicazioni biologiche più diffuse dell'EIS è la ricerca sulle cellule viventi. Questi studi si basano solitamente sulla geometria degli elettrodi di tipo ECIS, in cui le cellule vengono coltivate sugli elettrodi planari situati sul fondo della piastra di Petri modificata come mostrato nella figura 3.19 e inclusa sul trasduttore BF-DO0407SDPZ del progetto BioFEVI (Rif. manifesto di ricerca scientifica)

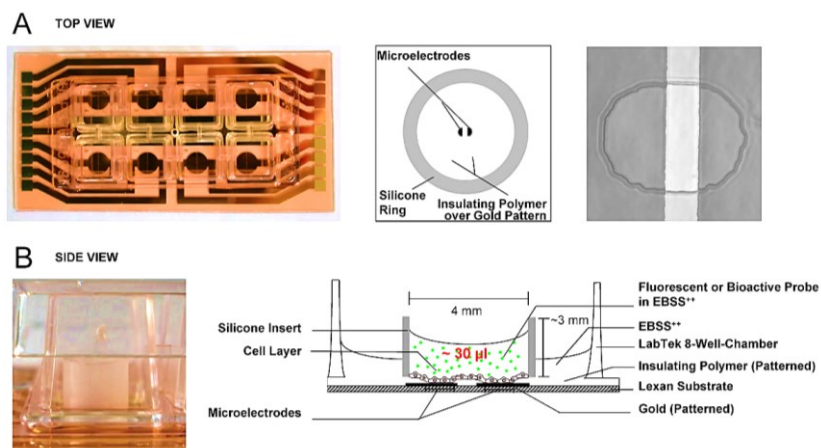


Figura 3-19: Petri su elettrodi planari per applicazioni ECIS

L'analisi della risposta dell'immittanza degli elettrodi risolta nel tempo permette al sistema BioFEVI di stimare il numero di cellule sull'elettrodo, la motilità o la vitalità delle cellule, ecc. Ad oggi, esistono due sistemi disponibili in commercio che possono essere utilizzati per svolgere questo compito:

Lo **ECIS** della *Applied Biophysics* e lo **xCelligence** della *ACEA Bioscience*, anche se il presente progetto di ricerca BioFEVI potrebbe essere candidato ad occupare una nuova posizione nel mondo dell'ECIS e dei sistemi di Bio-Impedenza EIS definendo di fatto un possibile terzo prodotto, innovativo che ingloba entrambe i sistemi ECIS e una nuova tipologia di EIS denominata EISDAC-VI Real Time. Di seguito verranno esplicitate alcune caratteristiche del sistema xCelligence per poi concludere con il sistema BioFEVI di cui parleremo nell'ultimo capitolo.



Figura 3-21: ECIS Model Z Theta

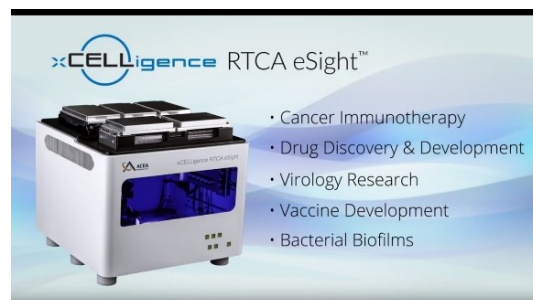


Figura 3-20: xCELLigence RTCA eSight

Nonostante l'xCelligence produca misure di immittanza a una sola frequenza (10 kHz), e quindi in generale non sia uno spettroscopio, può essere utilizzato con successo in diversi campi di applicazioni di ricerca sulle cellule. È opportuno sottolineare che il risultato in uscita fornito da xCelligence corrisponde ad un'impedenza *normalizzata*, denominata *Indice di cella* che possiamo scrivere come $CI = (Z(t) - Z(0)) / Z(0)$, dove $Z(t)$ è la grandezza dell'impedenza alla frequenza di 10 kHz al tempo t e $Z(0)$ è la grandezza dell'impedenza all'inizio dell'esperimento. Una delle possibili applicazioni di xCelligence - la costruzione della curva di crescita di particolari tipi di cellule tumorali epiteliali - è illustrata in figura 3.22. Essa



Figura 3-22: Evoluzione dell'impedenza di un elettrodo coperto di cellule (nero, arancio) e di un elettrodo vuoto (blu).

rappresenta l'evoluzione dell'impedenza di due elettrodi: uno ricoperto di cellule e l'altro di controllo (senza cellule).

(Nota Fig. 3.22., Durante la fissazione e la crescita delle cellule, l'impedenza dell'elettrodo ricoperto di cellule mostra una crescita logistica. Al contrario, l'impedenza dell'elettrodo vuoto è stabile nel tempo. Questo risultato conferma il modello di Giaever-Keese (Paragrafo 3.2.3).)

Si può notare che l'*indice di cella* dell'elettrodo vuoto è stabile nel tempo, mentre l'*indice di cella* dell'elettrodo ricoperto di cellule mostra un aumento logistico, che è legato alla crescita e all'espansione delle cellule. Quindi, i dati presentati nella figura 3.22 confermano qualitativamente il modello di Giaever Keese.

Un'altra importante applicazione del bio-EIS per la ricerca sulle cellule è l'identificazione dello stato cellulare. A titolo di esempio, si descrive un esperimento eseguito sia con il dispositivo xCelligence e con il trasduttore BF-DO0407SDPZ basato sull'array di multi elettrodi e filtrazione adattiva per l'analisi del segnale. Come campione si sono nuovamente utilizzate le cellule tumorali dell'epitelio. Il protocollo sperimentale è stato banale: si è misurato l'immittanza del metallo/elettrolita/cellula prima e dopo l'aggiunta della tossina Triton x100 al terreno cellulare, i risultati sono presentati nelle Figura. 3.23 e 3.24.

Come si può vedere dalla figura 3.23, gli indici cellulari misurati da xCelligence prima e dopo l'aggiunta della tossina sono nettamente diversi. Questo effetto è riconducibile al modello di Giaever-Keese: a causa della distorsione della membrana delle cellule morte, l'elettrodo ricoperto da queste ultime presenta un'impedenza più bassa rispetto all'elettrodo ricoperto di cellule vive, vedi figura 3.15 (b). Pertanto l'EIS permette di distinguere tra cellule vive e morte. Tuttavia, xCelligence fornisce misurazioni solo a una singola frequenza e per questo motivo non fornisce una stima affidabile della vitalità cellulare. Un'immagine simile a quella della figura 3.23 può essere ottenuta distruggendo il rivestimento dielettrico degli elettrodi o aumentando la conduttività del mezzo cellulare dopo l'aggiunta di una tossina. Per aumentare significativamente l'affidabilità dell'EIS come metodo per stimare la vitalità delle cellule, è necessario eseguire le misure in un ampio spettro di frequenza e utilizzare un elettrodo di controllo (vuoto) situato nello stesso mezzo di coltura. Queste due modifiche permetteranno di distinguere i fenomeni biologici da quelli fisico-chimici.

I chiari vantaggi dell'approccio ad ampio spettro con l'uso di elettrodi multipli sono mostrati nella figura 3.24. Si può notare che l'impedenza dell'elettrodo di controllo è stabile dopo l'aggiunta di una tossina; quindi, la conducibilità del mezzo non cambia durante

l'esperimento. Al contrario, per l'elettrodo con le cellule, la parte ad alta frequenza dell'impedenza diminuisce con l'aggiunta della tossina. Questa diminuzione dell'impedenza è direttamente causata dalla distruzione della membrana cellulare, cioè la morte cellulare come mostrato in figura 3.15(b), confermata anche dai dati della microscopia a fluorescenza come mostrato in figura 3.24 (a, b). Allo stesso tempo, la parte a bassa frequenza degli spettri degli elettrodi mostra un comportamento simile alla capacità, si vedano le equazioni (39) e (30), quindi gli elettrodi non si distruggono durante l'esperimento. Pertanto, rispetto ai metodi EIS

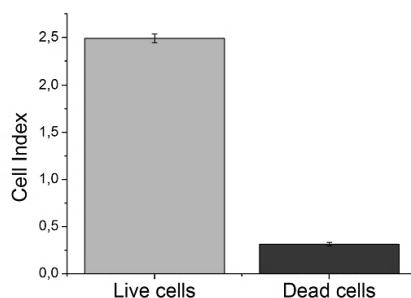


Figura 3-23: Effetto dell'aggiunta di una tossina sull'impedenza metallo/elettrolita/cellula

a singola sinusoide, un approccio EIS ad ampia frequenza basato su un array di multi elettrodi fornisce dati affidabili e robusti ai fenomeni non biologici che influenzano l'immittanza.

(Nota Fig. 3.23., Si può notare che l'elettrodo con cellule morte ha un'impedenza significativamente più bassa rispetto all'impedenza dell'elettrodo con cellule vive. I dati sono stati mediati su tre misurazioni; L'istogramma di errore corrispondono all'intervallo di confidenza del 99,9%.)

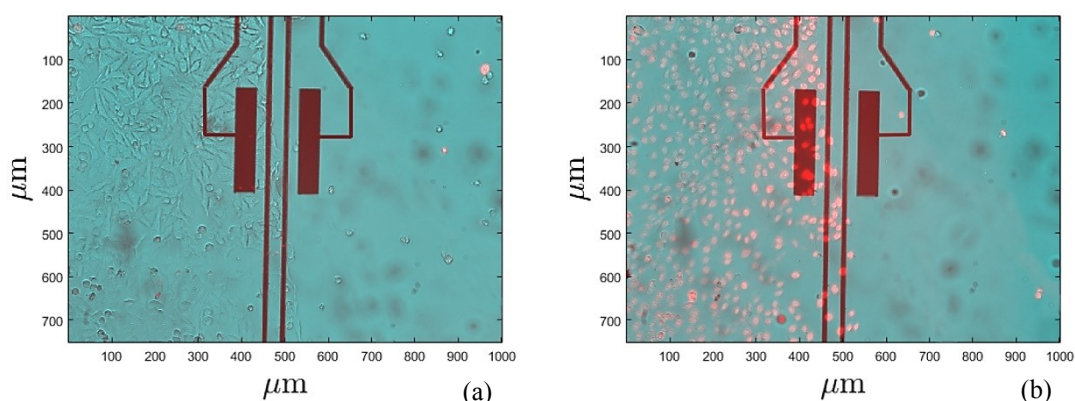
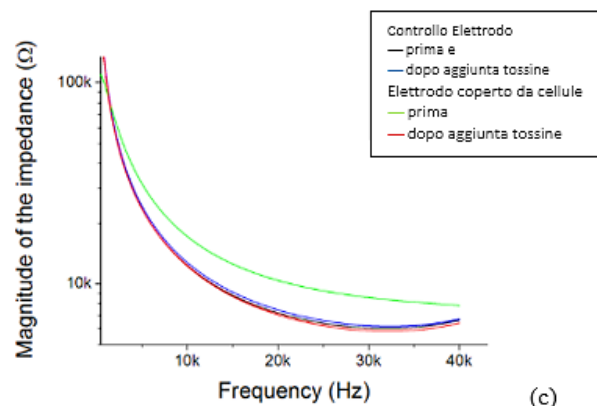


Figura 3-24: L'effetto dell'aggiunta di una tossina sull'interfaccia metallo/elettrolita/cellula (Policlinico U.1° Roma)



(Nota Fig. 3.24., L'effetto dell'aggiunta di una tossina sull'interfaccia metallo/elettrolita/cellula misurato in un'ampia gamma di frequenze. (a) e (b) una pseudo-fotografia di cellule prima e dopo l'aggiunta della tossina. Il colore rosso corrisponde al colorante ioduro di propidio di fluorescenza nei nuclei delle cellule morte. Il colore blu corrisponde all'immagine luminosa del campione in controllo. (c) Spettri di impedenza. Si può notare che dopo l'aggiunta di una tossina, la parte ad alta frequenza dell'impedenza dell'elettrodo coperto di cellule diminuisce fino al livello dell'elettrodo di controllo vuoto. Tuttavia, la parte a bassa frequenza dello spettro mostra un comportamento simile alla capacità, il che significa che gli elettrodi non vengono distrutti e che la diminuzione dell'impedenza è effettivamente causata dall'effetto biologico. I spettri sono mediati su tre misurazioni. Gli intervalli di confidenza ottenuti per un'affidabilità del 99,9% sono molto piccoli e quindi omessi dal grafico.)

- Ricerca nelle applicazioni Mediche: L'EIS trova anche un'ampia gamma di applicazioni in campo medico e sanitario. Uno degli esempi è la cardiografia ad impedenza, ovvero il monitoraggio dell'attività cardiaca attraverso la misurazione dell'impedenza del torace del paziente. In letteratura si considerano due meccanismi che influenzano la variazione dell'impedenza rispetto alla sistole cardiaca. Il primo meccanismo si basa sul fatto che il sangue ha un'elevata conduttività rispetto ai tessuti. Pertanto, l'aumento del volume di sangue nel torace determina una diminuzione della sua resistenza. Il secondo meccanismo riguarda il fenomeno dell'orientamento degli eritrociti. A causa delle sollecitazioni meccaniche nel sangue, gli eritrociti a forma di disco si dispongono parallelamente al flusso sanguigno, con il risultato di diminuire la resistenza del sangue e quindi del torace. Pertanto, la cardiografia ad

impedenza riflette l'attività di pompaggio del cuore, contrariamente a quanto avviene all'elettrocardiografia che rileva l'attività elettrica del cuore. Un evidente vantaggio della cardiografia impedenzometria rispetto all'elettrocardiografia è l'elevata immunità al rumore. Il segnale della cardiografia a impedenza può essere aumentato ad ampiezze più elevate rispetto a quelle dell'elettrocardiografia ed è robusto alle interferenze con le frequenze industriali (50 o 60 Hz), perché la misurazione ad impedenza cardiografia viene eseguita a frequenze più elevate. Un'altra applicazione medica dell'EIS è la diagnostica patologica, compresa l'individuazione del cancro. Anche se lo spettro di impedenza dei tessuti può variare per pazienti diversi, per il rilevamento delle malattie si possono confrontare gli spettri di impedenza di organi accoppiati, uno dei quali è sano e l'altro patologico. Ad esempio, in genere il tessuto canceroso ha una resistenza più bassa rispetto al tessuto normale. Questo fenomeno e la tecnica basata su di esso viene ad esempio applicata per la diagnosi precoce del cancro al seno. La differenza delle impedenze dei tessuti patologici e di quelli sani viene utilizzata anche per il rilevamento del cancro della pelle. Queste tecniche diagnostiche vengono eseguite utilizzando un sensore multi elettrodo per la misurazione dell'impedenza in vivo di due regioni della pelle: la regione di interesse, che potrebbe contenere un tumore, e la regione vicina sana. Ad esempio, se il cancro tumorale presente sulla pelle del braccio, è possibile utilizzare le regioni controlaterali per tale sondaggio, come riportato (Fun, et. al., 2018). Il rilevamento del cancro della pelle basato sull'impedenza consente di distinguere le regioni della pelle sane da quelle patologiche, aprendo nuove prospettive nel monitoraggio oncologico. Va inoltre notato che l'EIS è largamente utilizzata non solo nella diagnostica del cancro, ma anche nella ricerca sul cancro.

Il fatto che tessuti diversi abbiano conducibilità diverse potrebbe essere utilizzato per fornire una tomografia di impedenza, cioè per visualizzare lo spazio all'interno del corpo attraverso misure di impedenza. Questa tecnica diagnostica utilizza di solito un array di elettrodi che vengono posizionati sul corpo attorno al volume di interesse, ad esempio attorno al torace. Le impedenze degli elettrodi vengono misurate e poi, applicando speciali algoritmi di ricostruzione i loro valori vengono utilizzati per costruire l'immagine 3D della regione corporea che si sta esaminando. Questo tipo di tomografia fornisce una diagnostica in tempo reale, poco costosa e di facile attuazione. Un altro vantaggio è l'assenza di rischi, perché le basse correnti sono sicure per l'uomo, a differenza, ad esempio, dei raggi X. Questa proprietà non pericolosa della tomografia ad impedenza è estremamente utile per il monitoraggio della salute dei pazienti affetti da pneumologia e tutela la salute dei pneumologi che li assistono. Inoltre, con l'utilizzo della tomografia ad impedenza a più frequenze è possibile fornire

un'ulteriore caratterizzazione dei tessuti, come già detto. Per esempio, la tomografia ad impedenza è applicabile per la rilevazione del cancro al seno anche senza confronto con la ghiandola sana. Un'altra applicazione della tomografia ad impedenza riguarda la visualizzazione del cervello, il controllo della temperatura nell'oncoterapia dei tumori, la diagnostica del tratto gastrointestinale e il monitoraggio del torace nell'industria aeronautica.

La spettroscopia di impedenza è utilizzata anche negli impianti elettronici come strumento di caratterizzazione senza etichetta. Ad esempio, le misure di impedenza sono utilizzate nel dispositivo di visione protesica Argus II per la diagnostica dell'interfaccia tra la retina e gli elettrodi di stimolo. Questa interfaccia determina la qualità della percezione visiva del paziente e può essere descritta anche dal modello di Giaever-Keese. Se gli elettrodi sono a contatto con le cellule della retina, la loro impedenza sarà relativamente alta. Al contrario, se gli elettrodi hanno una bassa impedenza, significa che l'array di stimoli impiantabili si è staccato dalla retina e il paziente deve consultare un medico. Infine, se l'elettrodo presenta una magnitudine di impedenza molto alta, significa che l'elettrodo è bruciato o danneggiato. In questo caso, l'elettronica dell'impianto spegnerà l'elettrodo guasto e accenderà uno degli elettrodi riservati vicini. È opportuno sottolineare che nelle protesi visive e uditive l'impedenza degli elettrodi di stimolo è la loro caratteristica principale e gli ingegneri cercano di ridurla il più possibile.

- *Ricerca nelle Bio-materia e biosensoristica*: Essendo una tecnica non ottica, priva di etichette, sensibile e di facile attuazione, l'EIS ha trovato molte applicazioni nella biosensoristica e nello studio della materia biologica. Ad esempio, l'EIS è stato proposto come metodo per la rilevazione del glucosio nei campioni biologici. Il dispositivo simile all'ECIS ha permesso di rilevare il glucosio. Si è mostrata una differenza quantitativa negli spettri di impedenza dell'interfaccia metallo/sangue per differenti concentrazioni di glucosio in campioni di sangue. Questa tecnica può essere utile per dispositivi portatili sul corpo. L'EIS è utilizzata anche per lo studio delle biomolecole. In particolare, è stata studiata a fondo l'interfaccia metallo/proteina. È stato dimostrato che l'immittanza dell'interfaccia metallo/proteine dipende in modo significativo dalla struttura e dallo stato della proteina. Insieme all'approccio analogo all'impedenza della rete proteica, questi risultati possono aprire la strada per lo sviluppo di nuovi strumenti basati sull'EIS per l'indagine sulle proteine. Un'altra promettente applicazione di biosensing EIS è il rilevamento dei virus. Diversi gruppi scientifici hanno recentemente dimostrato che è possibile rilevare i virus misurando l'impedenza degli elettrodi, la cui superficie è modificata da anticorpi. Questi sensori sono relativamente poco costosi, di facile implementazione e realizzabili in dispositivi portatili, il

che è importante per la medicina personalizzata. Inoltre, l'EIS fornisce una rilevazione sensibile con limiti di rilevamento 8 ng/ml e ~ 100 virioni per μl e con velocità quantificata in ~ 30 minuti il rilevamento del virus in prossimità dell'involucro fisiologico. Inoltre, un EC fenomenologico per elettrodi modificati con anticorpi, insieme a convenienti metodi risolutivi, aprono la strada a tecnologie di biosensing dei virus più informative e affidabili. Generalmente si propone di utilizzare sensori virali EIS basati su cellule, il cui principio di funzionamento si basa direttamente sul modello di Giaever-Keese: l'aggiunta dei virus al terreno delle cellule, che riducono drasticamente l'impedenza degli elettrodi coperti da questi ultimi. Quindi, monitorando l'impedenza dell'interfaccia elettrodo-cellula è possibile rilevare i virus senza una speciale preparazione dell'elettrodo con anticorpi e altre modifiche della superficie. Inoltre, i sensori di virus EIS basati su cellule, a differenza dei comodi kit ELISA e ai metodi di PCR in tempo reale, possono reagire su tipi sconosciuti di virus e possono essere utilizzati più volte, in quanto le loro proprietà di rilevamento del virus possono essere ripristinate trattando gli elettrodi in uno sterilizzatore a vapore ad alta pressione e con successiva semina di cellule su di essi. Va inoltre sottolineato che oggi i biosensori basati sulle cellule hanno trovato diverse applicazioni nella ricerca sulle malattie virali. Per riassumere, le tecnologie di rilevamento dei virus basate sull'EIS forniscono uno strumento di speranza per combattere diverse malattie virali come la sindrome da immunodeficienza, l'infezione da virus, in particolare, il virus della febbre dengue e il COVID19.

Infine, vale la pena ricordare che l'EIS può essere utilizzato per studiare le membrane cellulari in combinazione con la tecnologia patch-clamp.

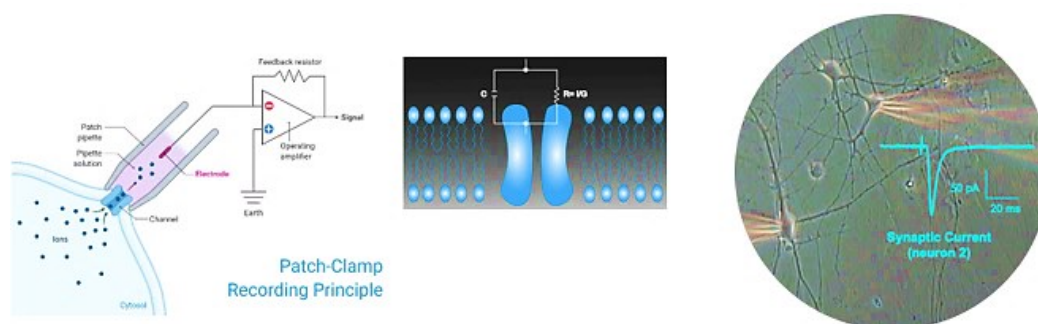


Figura 3-25: Registrazione cellulare tramite patch-clamp astrocitario

In questa tecnica diagnostica, una membrana cellulare è attaccata a un micro tubo di vetro con un diametro di $\sim \mu\text{m}$, riempito di elettrolita. Due elettrodi di AgCl sono posizionati nel micro tubo e nel mezzo cellulare, l'impedenza viene misurata tra questi elettrodi. Poiché l'impedenza della membrana è significativamente più alta dell'impedenza dell'interfaccia

elettrodi/elettrolita, come mostrato in Tabella 3.1, il suo valore determinerà l'immittanza tra gli elettrodi. Di conseguenza, la combinazione di un patch-clamp con l'EIS consente di valutare la conduttività della membrana cellulare, la resistività dei canali ionici nella membrana cellulare e altre importanti caratteristiche elettriche di una cellula. Ad esempio, questa tecnica basata su Fourier EIS permette di rilevare che i neuroni viventi possono regolare la loro capacità in risposta a cambiamenti dell'area della membrana.

3.5 Conclusioni

In questa dissertazione volta allo sviluppo del progetto BioFEVI, abbiamo esaminato la moderna spettroscopia di impedenza elettrica dal punto di vista teorico e sperimentale, prestando particolare attenzione alle sue applicazioni nella ricerca cellulare, nella medicina, compreso lo studio dei virus, del cancro, e nel biosensing. Ci si augura che sia utile agli studenti come rapida introduzione all'EIS e agli scienziati e agli ingegneri come manuale sull'EIS. Tuttavia, non mi aspetto che questo studio possa sostituire completamente le opere classiche e moderne sull'EIS. Per ulteriori letture, possono essere utilizzati documenti specialistici che descrivono in modo approfondito la spettroscopia di impedenza elettrica e la sua applicazione all'elettrochimica osservando i seguenti aspetti:

- Tecnica EIS ad alta velocità basata sulla trasformazione di Fourier;
- Tecnica ad alta velocità, l'EIS adattativa;
- L'approssimazione complessa non lineare ai minimi quadrati, uno strumento all'avanguardia per l'analisi degli spettri EIS;
- Biosensoristica basata sull'EIS;
- Ricerche di biologia cellulare condotte con l'EIS;
- Tomografia ad impedenza;
- Apparecchiature di misura basate su EIS;
- L'introduzione più semplice ed elegante all'EIS nelle lezioni di Richard Feynman "*The Feynman Lectures on Physics*", first edition al capitolo 25-5.

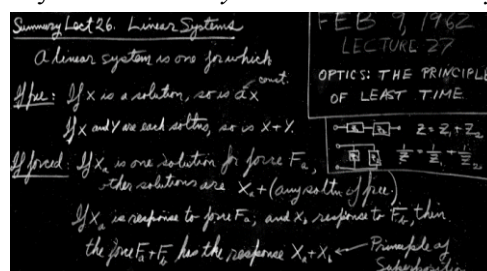


Figura 3-26: Impedenze in serie e in parallelo

Capitolo 4

BIO-EIS DAC-VI:

A RELIABLE BIO-FINFETs EISDAC-VI IMMITTANCE BIO-ELECTRICAL TRANSDUCER FOR DYNAMIC ANALYSIS OF APOPTOSIS IN VIRAL COCHLEAR INFECTIONS

Un progetto sperimentale obsidiano di ingegneria biomedica per la rigenerazione anatomica e funzionale delle cellule uditive, in grado di fornire una valutazione dell'espressione e/o identificazione virale nelle ipoacusie neurosensoriali improvvise o in quelle patologie oncologiche inerenti al distretto testa-collo, è inoltre possibile valutare nel tempo l'espressione di determinate citochine o la variazione dell'alterazione tissutale dovuta a meccanismi infiammatori. BioFEVI Genomic project e una tecnologia di biosensing genomica e proteomica.

Qual è il significato di questo progetto?

Molte malattie virali e agenti esterni tossici per l'uomo portano molto spesso a un malfunzionamento o a un'alterazione della funzione cellulare che subisce mutazioni dovute a specifiche alterazioni genomiche che, nei casi peggiori, causano il cancro.

La ricerca proposta nasce dall'unione di tre macro discipline scientifiche (l'ingegneria elettronica/ biomedica, la Genomica/Proteomica e le discipline mediche inerenti il distretto testa/collo) che hanno come obiettivo quello di identificare nuove e specifiche sequenze di frammenti nucleotidici come elementi indicativi di una possibile alterazione cellulare e dei suoi meccanismi inferenziali, nell'atto della pre-oncogenesi.

Nel 2020, è stata avviata una collaborazione con i dipartimenti D.A.I Testa-Collo e ORL della Unità Operativa Complessa di Audiologia del Policlinico Universitario Umberto I° di Roma dove si è definito un protocollo quinquennale di ricerca necessario per raggiungere gli obiettivi prefissati.

Quali sono gli obiettivi del progetto?

L'obiettivo finale del progetto è l'identificazione e la correlazione di micro RNA specifici, rilevabili in tempo reale dal trasduttore Bio-FEVI (acronimo di Bio-FinFETs EISDAC-VI) che darà una risposta precisa sulla formazione di cellule pre-oncogene e successivamente intercettare il possibile sviluppo di uno specifico tipo di cancro.

Complessivamente, le fasi del progetto sono quattro, la prima delle quali è inerente l'ottimizzazione del sistema di lettura elettronica del trasduttore mentre per quanto concerne la quarta fase questa si incentra sull'ulteriore ottimizzazione del sistema di lettura elettrochimica del trasduttore Bio-FEVI e l'identificazione di nuovi miRNA specifici per alcune specie tumorali, prima di giungere alla fase di rilascio e commercializzazione del dispositivo nonché alla fase di produzione e il rilascio della pubblicazione scientifica relativa a questa innovativa strumentazione per la diagnosi e la prevenzione medica/oncologica.

Gli Investigators e Sponsor del progetto:

Primary Investigators: Valeriano Bonuglia 1, Claudia Pelosi 2, Giuseppe Attanasio 3, Carlo Cavaliere.

1. *Laboratory of Advanced Techniques for energy engineering, DEIM, University of Tuscia; valeriano.bonuglia@unitus.it*
2. *Laboratory of Diagnostics and Material Science, DEIM, University of Tuscia; pelosi@unitus.it*
3. *D.A.I. Head-Neck, otorhinolaryngology's Unit, University Polyclinic Umberto 1° Rome, Sapienza University; giuseppe.attanasio@uniroma1.it*
4. *D.A.I. Head-Neck, Unit of ENT, Complex Operating Unit of Audiology, DU organs of sense, University Polyclinic Umberto 1° Rome, Sapienza University; carlo.cavaliere1@uniroma1.it*

*Sponsor: Collaborative Drug Discovery Inc. ***

*** Correspondence: Ben Retamal, Nine Hills Road Cambridge, CB2 1GE United Kingdom
Phone: +44 (0) 1223 803830 Mob: +44 7771 358 212 (preferred) Skype: ben.retamal, e-mail: bretamal@collaborativedrug.com*





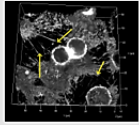
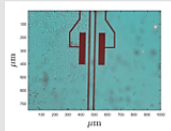
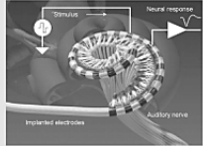


BIO-ELECTRICAL IMMITTANCE SPECTROSCOPY FOR DYNAMIC ANALYSIS OF APOPTOSIS IN VIRAL COCHLEAR INFECTIONS

Bio-EIS DAC-VI

An Experimental Biomedical Engineering Project in Anatomical and Functional Regeneration of Auditory Cells

A Reliable Bio-FinFETs EISDAC-VI Immittance Bio-Electrical Transducer for Dynamic Analysis of Apoptosis in Viral Cochlear Infections

Valeriano Bonuglia ^a, Claudia Pelosi ^b

^a Laboratory of Advanced Techniques for energy engineering, DEIM, University of Tuscia, Largo dell'Università, Viterbo, Italy

^b Laboratory of Diagnostics and Material Science, DEIM, University of Tuscia, Largo dell'Università, Viterbo, Italy

Giuseppe Attanasio ^c, Antonio Greco ^d, Massimo Ralli ^e, Francesca Yoshie Russo ^f, Carlo Cavaliere ^g

^c D. A. I. Testa-Cella, unità di Otorinolaringoiatria, Policlinico Universitario Umberto 1° Roma, Università Sapienza

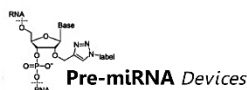
^d D. A. I. Testa-Cella, unità di ORL, Unità Operativa Complessa di Audiologia, DU organi di senso, Policlinico Universitario Umberto 1° Roma, Università Sapienza

^e ASD-NEOlogia Otorinolaringoiatria, Dipartimento di Scienze, Sapienza Università di Roma

Figura 4-1: Locandina presentazione progetto BioFEVI

ATTENZIONE

Il protocollo sotto riportato va letto nella sua interezza se si vuole comprendere appieno il progetto di ricerca da me sviluppato in questa dissertazione.



ID03.1 - Protocollo Medico di ricerca e Pianificazione R&S Prototipi avanzati e innovativi

Dynamic analysis of apoptosis in viral cochlear and rhino pharyngeal infections

Primary Investigators: Valeriano Bonuglia ¹, Giuseppe Attanasio ², Carlo Cavaliere ³

- ¹ Laboratory of Advanced Techniques for energy engineering, DEIM, University of Tuscia; valeriano.bonuglia@unitus.it
- ² D.A.I. Head-Neck, otorhinolaryngology's Unit, University Polyclinic Umberto 1° Rome, Sapienza University; giuseppe.attanasio@uniroma1.it
- ³ D.A.I. Head-Neck, Unit of ENT, Complex Operating Unit of Audiology, DU organs of sense, University Polyclinic Umberto 1° Rome, Sapienza University; carlo.cavaliere1@uniroma1.it

Sponsor: Collaborative Drug Discovery Inc. **

** Correspondence: Ben Retamal, Nine Hills Road Cambridge, CB2 1GE United Kingdom Phone: +44 (0) 1223 803830 Mob: +44 7771 358 212 (preferred) Skype: ben.retamal, e-mail: bretamal@collaborativedrug.com

Titolo: Dynamic Analysis of Apoptosis in Viral Cochlear and rhino pharyngeal Infections;

Metodologia: Studio randomizzato, controllato, cieco;

Durata della ricerca:

Durata stimata del protocollo principale per la Fase 1 (dall'inizio screening dell'ultimo soggetto trattato e completamento dello studio) è di circa 2,5 anni;

Centri di Ricerca: Multi Centro (Laboratory of Advanced Techniques for energy engineering, DEIM, University of Tuscia, Viterbo 01100, Italia e D.A.I. Testa-Collo, unità di Otorinolaringoiatra, Policlinico Universitario Umberto 1° Roma, Italia);

Obiettivi: *Obiettivo Primario:* Valutare l'efficacia del BioFEVI (dotato di sottosistema di machine learning algorithms) nella identificazione dei biomarcatori e indicatori prognostici (miRNA); Nella ingegnerizzazione di inibitori specifici Ago-2 (farmacologia mirata ipotesi di applicazione su miR-21 con Espressione genica mirata ed Effetti: Crescita del colesteatoma, schwannomi vestibolari);
Nell'utilizzo per differenziare i sottotipi di SNHL e prevedere la prognosi;
Usandolo sui miRNA campionati da perilinfia per delineare profili tra SNHL e CHL e prevedere l'udito residuo dopo l'IC con una precisione del 100%; Nella malattia di Meniere (SNHL) utilizzando label and label-free detection Techniques for protein microarrays;
Identificazione dei biomarcatori e indicatori prognostici miRNA in risposta alla somministrazione locale di cortisone nell'orecchio medio membranamente collegato all'orecchio interno;
Determinazione del ruolo del miR-1 endoteliale nell'infiammazione allergica delle vie aeree e la riduzione di eosinofilia di CRS, correlazione con IL-13; Analisi, Studio e metodo applicazione da operare sulle risposte immunitarie di tipo 2, orchestrate da citochine derivate dalle cellule TH2, IL-4, IL-5 e IL-13, e la partecipazione di varie specie di RNA, compreso i microRNAs (Mirma) e RNA a catena lunga non codificante (lncRNA), nelle risposte immunitarie di tipo 2.

Citation: Valeriano, B.; Giuseppe, A.; Carlo, C.,

ID03.1 - Dynamic analysis of apoptosis in viral cochlear and rhino pharyngeal infections;

ID03.2 - A Reliable Bio-FinFETs EIS-DAC-VI Immittance BioElectrical Transducer.

Pre-miRNA Devices, Modified 2022.05.2

Received: 2021.17.4

Accepted: 2021.25.4

Released: 2021.26.4



Copyright: © 2022 by the authors.

Espacenet Patents: ITRM XXXXXX.XX

Obiettivi Secondari: Valutare l'efficacia del Bio-FEVI in applicazioni proteomiche e genomiche; Analisi e computazione della mole di dati derivante dai campioni di perilinf, compresi i predittori di perdita dell'udito, i marcatori di uno stato pro-infiammatorio; L'Identificazione dei meccanismi di perdita dell'udito in Tempo Reale; L'insieme di tutti i dati fisiologici, genomici e procedurali estrapolati.

Numero di soggetti:

210 soggetti randomizzati in tre gruppi; Prelievo e Controllo;

Diagnosi e principali criteri di inclusione:

Criteri di inclusione

Soggetti maschi e femmine, 18-70 anni, in qualsiasi distribuzione;
 Soggetti SNHL con CI e Schwannomi (*Neurinomi*);
 Soggetti con SNHL idiopatico monolaterale;
 Soggetti con malattia di Meniere;
 Soggetti SNHL subtypes;
 Soggetti con OMCC e OMC;
 T01 - Soggetti con malattie metaboliche complesse e oltre;
 TH2 – Soggetti con malattie immunomediate di tipo 2
 Vedere la sezione metodi per la lista completa dei criteri di inclusione.

Criteri di esclusione

Soggetti maschi e femmine di età inferiore ai 18 anni o di età superiore ai 70;
 Soggetti Fumatori e/o ulteriori fattori di rischio per la salute controindicati nella sperimentazione con BioFEVI;
 Coinvolgimento in altri studi in corso;
 Vedere la sezione metodi per la lista completa dei criteri di esclusione.

Prodotto di studio, campionamento della perilinf umana, percorso, regime:

Gruppo di prelievo:

Perilinf campionata come procedura a sé stante;
 Perilinf campionata da soggetti con impianto cocleare (pre e post);
 Perilinf campionata da soggetti CHL a mezzo Stapedectomy;
 Perilinf campionata da soggetti MD refrattario (SNHL) a mezzo ocleosacculotomia;
 Perilinf campionata da paziente mediante Metodo di RWM "Tap", profilazione e sottotipi;
 T01 - Campionamento Body fluids, blood flow per identificazione di Exosomal miRNAs, non Exosomal miRNAs and circulating miRNA (cir-miRNAs);
 TH2 – Campionamento Body fluids, blood flow per l'analisi dei meccanismi inferenziali delle citochine che regolano l'espressione dei miRNA e come specifici miRNA controllano la produzione di citochine nelle cellule T, inferenza della IL13 modulante, miRNAs di up-Regulated e Down-Regulated, lncRNA patogeno, miRNA-1 endoteliale.
 Esecuzione tamponi rinofaringei per prelievi microbiologici.

Gruppo di Controllo

Sicurezza del campionamento della perilinfia nella contemporaneità dell'atto di RWM e dell'inserimento dell'elettrodo di CI;

Impossibilità di prelievo Perilinfia a mezzo Stapedectomy in soggetti sottoposti a workup per SNHL;

Campionamento contaminato della perilinfia a mezzo RWM con capillare di vetro, sostituzione con nuovi Microneedles per campioni di 5uL;

Campionamento per prevedere soggetti idonei all'integrazione con neurotrofine o che potrebbero beneficiare di elettrodi di impianto cocleare a eluizione di farmaco.

Metodologia statistica:*Endpoint primario:*

Variazioni genomiche significative nei campioni per la presenza di biomarcatori di interesse, utilizzo dei Metodi bootstrap, Jackknife, Cross-validazione su campionamento;

Keywords: perilymph; round window; stapedectomy; cochlear implantation; sensorineural hearing loss, miRNA, cir-miRNAs, lncRNA, helminth, allergy, IL-4, IL-13, TH2, TSLP

Scopo

- *Nel contesto clinico*, la fisiopatologia dell'ipoacusia neurosensoriale è scarsamente delimitata e attualmente non sono disponibili test diagnostici per differenziare i **sottotipi**.

Questo troppo spesso lascia i soggetti con opzioni di trattamento generalizzato come gli steroidi, apparecchi acustici, o impianto cocleare.

Il trattamento standard per la localizzazione della malattia è la biopsia diretta o l'imaging del tessuto interessato. Ciò nonostante, l'inaccessibilità e la fragilità della coclea rendono queste tecniche difficili.

Pertanto, l'istituzione di una **biopsia indiretta**, un campionamento di fluidi interni, è necessaria per far progredire la diagnostica dell'orecchio interno e consentire lo sviluppo di nuove terapie per le malattie di questo organo sensoriale; Sostanzialmente il campionamento intraoperatorio della **perilinfia** attraverso la membrana a finestra rotonda della coclea nell'orecchio interno, necessaria alla trasduzione del suono è una promettente fonte per definire il proteoma, il metaboloma e il trascrittoma dell'organo ed è una potenziale fonte di scoperta di Biomarcatori.

Nonostante il suo potenziale di fornire informazioni sull'orecchio interno, patologie dell'orecchio interno, il campionamento della perilinfia umana continua ad essere controverso ed è attualmente eseguito solo in combinazione con una procedura pianificata in cui l'orecchio interno è aperto.

Considerando la sicurezza delle procedure in cui viene aperto l'orecchio interno, possiamo evidenziare gli studi in cui l'analisi della perilinfia ha avanzato la nostra conoscenza delle malattie dell'orecchio interno, e si suggerisce che il campionamento della perilinfia può essere fatto come una procedura **stand-alone**, avanzando così la nostra capacità di classificare con precisione l'ipoacusia neurosensoriale.

- *La classe dei fenomeni eziologici* della perdita uditiva tende ad essere multifattoriale colpendo una parte della popolazione globale. Nonostante le differenze nell'eziologia, un

cambiamento patologico fisico comune che porta alla perdita dell'udito è il danno alle cellule ciliate meccanosensoriali dell'orecchio interno.

I microRNA (miRNA) hanno dimostrato di avere un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'orecchio interno, pertanto possono avere un ruolo nello sviluppo o nella prevenzione della perdita dell'udito.

Il 1° scopo è esaminare il meccanismo d'azione dei miRNA nel sistema uditivo, in termini di ruolo dei miRNA nella regolazione genica, effetti delle mutazioni dei miRNA e della sovra espressione.

Si esaminerà il ruolo cruciale dei miRNA nel garantire il normale sviluppo fisiologico dell'orecchio interno come anche le deviazioni dalla funzione corretta dei miRNA nella coclea che induce danni deleteri alla struttura.

Basando fondamentalmente questa ricerca sui miRNAs si cercherà di postulare strade future per la ricerca. Una migliore conoscenza del ruolo dei miRNA nel sistema uditivo aiuterà a sviluppare nuove modalità di trattamento per ripristinare la funzione dell'udito basata su rigenerazione delle cellule ciliate dell'orecchio interno danneggiate.

Punti Salienti:

- *I microRNA (miRNA) svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo dell'orecchio interno.*
- *Una funzione anomala dei miRNA nel sistema uditivo è associata con la perdita dell'udito.*
- *Una migliore conoscenza delle vie di trasmissione dei segnali coinvolte nella rigenerazione delle cellule ciliate regolate da miRNAs aprirà la strada per lo sviluppo di nuove modalità di trattamento per la perdita dell'udito.*

- **T01** Il contributo degli RNA non codificanti, come i microRNA (miRNA) nella regolazione degli stati fisiologici e patologici è stato intensamente chiarito durante gli ultimi anni.

La scoperta dei miRNA circolanti (cir-miRNA) in una varietà di fluidi corporei, è, tuttavia un recente focus di interesse nella comprensione degli stati fisiopatologici delle loro cellule/organi di origine. Ancora un altro stimolante dibattito che porta i miRNA al livello successivo è la loro presenza negli *esosomi*, e questa è un'area di ricerca davvero interessante. Gli esosomi sono vescicole extracellulari derivate dalle cellule e sono veicoli biologici naturalmente dotati che non solo permettono il trasferimento funzionale di miRNA tra le cellule (trasferimento orizzontale) ma anche favorire la comunicazione inter-organo, presumibilmente guidato da organi recettori speciali decorati sulla loro superficie. Tuttavia, le conoscenze sulla comunicazione inter-organo elicitata dalle impronte *esosomali-miRNA* specifiche dei tessuti rimangono sfuggenti.

Il tessuto adiposo contribuisce a una grande frazione di impronte di exosomal-miRNA specializzate nella circolazione sanguigna. Evidenze sperimentali sottolineano il tessuto adiposo come deposito principale di cir-miRNA che navigano attraverso il flusso sanguigno e raggiungono gli organi distali, soprattutto il fegato, dove regolano l'espressione genica del tessuto ospite ed elicitano il controllo metabolico. Questo sembra essere una forma genetica di adipochine (fattori endocrini secreti dal tessuto adiposo).

Il 2° scopo è rivedere tale metabolico offshore e fare uno sforzo per affrontare alcuni importanti collegamenti mancanti tra i miRNA processati e la loro incorporazione dentro gli esosomi. Forniremo potenziali valutazioni su come questa conoscenza potrebbe essere indirizzata verso la terapia basata su RNA per il monitoraggio di malattie metaboliche complesse e oltre.

- **TH2** Le malattie immunologiche, tra cui l'asma, l'autoimmunità e le immunodeficienze, colpiscono una percentuale crescente della popolazione con significativi bisogni medici

insoddisfatti. Per risolvere queste complesse malattie genetiche spesso influenzate dall'ambiente, stanno emergendo nuovi percorsi terapeutici mirati. Le specie di RNA non codificanti, che regolano le risposte epigenetiche, trascrizionali e traslazionali, sono regolatori critici dello sviluppo delle cellule immunitarie, della differenziazione e della funzione effettrice, e possono rappresentare una nuova classe di obiettivi terapeutici. In questa ricerca ci concentreremo sulle risposte immunitarie di tipo 2, orchestrate dalle citochine derivate dalle cellule TH2, IL-4, IL-5 e IL-13, che stimolano una varietà di risposte immunitarie e tissutali, comunemente indicate come immunità di tipo 2. Il coinvolgimento di varie specie di RNA, compresi i microRNA (miRNA) e i long non-coding (lncRNA), nelle risposte immunitarie di tipo 2 e nelle impostazioni di malattia sia cliniche che precliniche, hanno evidenziato molte lacune che andremo ad indagare.

Il 3° scopo è quello di indagare ed approfondire gli aspetti della downregulation dei miR-34/449 da parte di IL-13 che contribuisce plausibilmente e significativamente alla espressione delle funzioni patogene di IL-13. Considerando che i precisi meccanismi molecolari con cui l'IL-13 modula questa famiglia di miRNA non sono chiari, si può comunque ipotizzare che questo rappresenti un'apertura per intervenire terapeuticamente nell'asma allergica.

- I processi biologici richiedono l'integrazione di stimoli ambientali a livello dell'espressione genica. La robustezza delle reti genetiche dipende dalla distinzione tra risposte fisiologiche (a particolari segnali) e "rumore" biologico (variazioni stocastiche), che può essere ottenuto, per esempio, stabilendo cicli trascrizionali feed-forward. I microRNA come regolatori dell'espressione proteica interagiscono con i cicli trascrizionali e stabiliscono ulteriori soglie, che permettono alle cellule di filtrare i segnali fisiologici dal rumore; questo meccanismo regola l'espressione genica a livello post-trascrizionale e si basa appunto sui microRNA (miRNA). Questi sono una classe abbondante di piccole specie di RNA non codificanti (non tradotte), evolutivamente conservate, che controllano la stabilità, la degradazione e la traduzione degli mRNA bersaglio, influenzando così la maggior parte dei geni dei mammiferi. Oltre 100 diversi miRNA hanno dimostrato di essere espressi dalle cellule del sistema immunitario, dove influenzano le vie molecolari che controllano lo sviluppo e la funzione delle cellule immunitarie innate e adattive. Concentrandosi sulle cellule T, possiamo affermare che i miRNA regolano strettamente l'attivazione e la differenziazione delle cellule T. È anche importante notare che la trascrizione di alcuni miRNA presenti nelle cellule immunitarie, i cosiddetti immuno-miR, è stata modulata in risposta a stimoli infiammatori e citochine proinfiammatorie. Insieme questi risultati indicano che non solo i miRNA regolano la produzione di citochine, ma anche le citochine possono modulare i livelli di miRNA.

Il 4° scopo è rappresentato dallo ulteriore studio di questo doppio cross-talk tra miRNA e citochine quale obiettivo ultimo di questa ricerca.

Introduzione

Valutare l'efficacia del BioFEVI (dotato di sottosistema di machine learning algorithms) nella identificazione dei biomarcatori e indicatori prognostici (miRNA) come nelle malattie neurodegenerative, tra cui Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica e Parkinson; Nella ingegnerizzazione di inibitori specifici Ago-2 che regolano i miRNA e facilitano il legame del complesso all'mRNA per bloccare la traduzione e silenziare l'espressione genica (farmacologia mirata ipotesi di applicazione su miR-21 con Espressione genica mirata ed Effetti: Crescita del colesteatoma, schwannomi vestibolari);

Nell'utilizzo per differenziare i sottotipi di SNHL e prevedere la prognosi;

Usandolo sui miRNA campionati da perilinfia per delineare profili tra SNHL e CHL e prevedere l'udito residuo dopo l'IC con una precisione del 100%. Inoltre, il confronto

dei profili di miRNA tra soggetti con otosclerosi (CHL) e malattia di Meniere (SNHL) utilizzando label and label-free detection Techniques for protein microarrays per evidenziare miRNA differenzialmente espressi nella perilinfia dei soggetti con malattia di Meniere, patologie virali, autoimmuni, o neuro fibromi del nervo acustico;

Identificazione dei biomarcatori e indicatori prognostici miRNA in risposta alla somministrazione locale di cortisone nell'orecchio medio membranalmente collegato all'orecchio interno;

Determinazione del ruolo del miR-1 endoteliale nell'infiammazione allergica delle vie aeree e la riduzione di eosinofilia di CRS, correlazione con IL-13; Analisi, Studio e metodo applicazione da operare sulle risposte immunitarie di tipo 2, orchestrate da citochine derivate dalle cellule TH2, IL-4, IL-5 e IL-13, che stimolano una varietà di risposte immunitarie e tissutali, comunemente denominate immunità di tipo 2, per queste ultime identifichiamo la partecipazione di varie specie di RNA, compreso i microRNAs (MiRNA) e RNA a catena lunga non codificante (lncRNA), nelle risposte immunitarie di tipo 2 ed in entrambe le regolazioni cliniche e precliniche della malattia. Si evidenzieranno i risultati, identificando le lacune cercando di dare una risposta alle nuove opportunità di trattamento per curare queste malattie.

Valutare l'efficacia del Bio-FEVI in applicazioni proteomiche e genomiche, che consentono di definire l'espressione dei miRNA per la predizione dello stato della segnalazione delle neurotrofine nei soggetti con impianto cocleare; Analisi e computazione della mole di dati derivante dai campioni di perilinfie, compresi i predittori di perdita dell'udito, i marcatori di uno stato pro-infiammatorio, i fattori che proteggono l'orecchio interno durante l'intervento chirurgico e potenziali predittori dei risultati dell'eventuale impianto cocleare; L'Identificazione dei meccanismi di perdita dell'udito in Tempo Reale permetterà anche ottimizzare l'intervento farmacologico mirato FBDD; L'insieme di tutti i dati estrapolati potrà essere resa disponibile prima di iniziare un trattamento pianificato di IC.

Obiettivi della ricerca

Valutare l'efficacia del BioFEVI (dotato di sottosistema di machine learning algorithms):

1. Nella identificazione dei biomarcatori e indicatori prognostici (miRNA);
2. In farmacologia mirata ipotesi di applicazione su miR-21 con Espressione genica mirata ed Effetti: Crescita del colesteatoma, schwannomi vestibolari;
3. Per differenziare i sottotipi di SNHL e prevedere la prognosi;
4. Sui miRNA campionati da perilinfia per delineare profili tra SNHL e CHL e prevedere l'udito residuo dopo l'IC;
5. Confronto dei profili miRNA tra soggetti con otosclerosi (CHL) e malattia di Meniere (SNHL) utilizzando labeled and label-free detection Techniques for protein microarrays per evidenziare miRNA differenzialmente espressi nella perilinfia dei soggetti con malattia di Meniere, patologie virali, autoimmuni, o neuro fibromi del nervo acustico;
6. Determinazione del ruolo del miR-1 endoteliale nell'infiammazione allergica delle vie aeree e la riduzione di eosinofilia di CRS, correlazione con IL-13;
7. Analisi, Studio e metodo applicazione da operare sulle risposte immunitarie di tipo 2, orchestrate da citochine derivate dalle cellule TH2, IL-4, IL-5 e IL-13;
8. L'Identificazione dei meccanismi di perdita dell'udito in Tempo Reale.
9. L'identificazione e correlazione di specifici micro RNA rilevabili in tempo reale dal Trasduttore Bio-FEVI il quale darà una precisa risposta in seno alla formazione di cellule pre-oncogene quindi di intercettare il possibile sviluppo di uno specifico tipo di tumore.

Durata della ricerca

Durata stimata del protocollo principale per la Fase 1 (dall'inizio screening dell'ultimo soggetto trattato e completamento dello studio) è circa 2,5 anni su 5 complessivi;

Table 1. Gantt Progetto di Ricerca BioFEVI – Fase 1 di 4.

Task Name	Durata	Inizio	Fine	Predecessors
1. Progetto di Ricerca - BioFEVI - Fase 1	544 days	Tue 30/03/21	Fri 28/04/23	
2. Fase di Pianificazione: Protocollo Medico di ricerca, Ideazione, Studio, Analisi Funzionale e Tecnica dei dispositivi da ideare per il settore Biologico e Medico.	544 days	Tue 30/03/21	Fri 28/04/23	
3. Protocollo Medico di ricerca e Pianificazione R&S Prototipi avanzati e innovativi	20 days	Tue 30/03/21	Mon 26/04/21	255
4. Analisi di fattibilità (Attuazione Protocollo medico e R&S Prototipi innovativi)	50 days	Tue 27/04/21	Mon 05/07/21	3
5. Analisi Funzionale e Tecnica dei Prototipi avanzati da realizzare	77 days	Tue 06/07/21	Wed 20/10/21	4
6. Milestone	0 days	Wed 20/10/21	Wed 20/10/21	5
7. Progettazione delle parti del Progetto di ricerca BioFEVI (Fase 1 di 4)	347 days	Thu 21/10/21	Fri 17/02/23	6
8. External Milestone di Review della Progettazione Prototipi	0 days	Mon 20/06/22	Mon 20/06/22	
9. Milestone	0 days	Fri 17/02/23	Fri 17/02/23	7
10. Fase di Produzione: Realizzazione prototipi Trasduttori e Sensori, Test di readout elettronico	364 days	Thu 21/10/21	Tue 14/03/23	755
11. External Milestone di Review della Realizzazione Prototipi	0 days	Mon 20/06/22	Mon 20/06/22	
12. Milestone	0 days	Tue 14/03/23	Tue 14/03/23	10
13. Fase di Test parziali: Pianificazione e Test di funzionalità Selettiva dei Sensori per applicazioni Biologiche e mediche con impiego di Biomarkers noti	372 days	Thu 21/10/21	Fri 24/03/23	1055
14. External Milestone di Review del Banco prova	0 days	Mon 20/06/22	Mon 20/06/22	
15. Milestone	0 days	Fri 24/03/23	Fri 24/03/23	13
16. Fase di Test Finale: Trasduttore BioFEVI mediante l'impiego di Biomarkers noti	22 days	Fri 24/03/23	Mon 24/04/23	
17. Milestone	0 days	Mon 24/04/23	Mon 24/04/23	16
18. Documentazione di Ricerca Scientifica e Rilascio Presentazione finale	544 days	Tue 30/03/21	Fri 28/04/23	255

Complessivamente le fasi del progetto sono quattro di cui la **prima** sarà inerente l'ottimizzazione del readout elettronico del Trasduttore mentre nella **seconda** fase verranno espletati i Test per misurare il numero di cellule aderenti agli elettrodi, stimare la vitalità delle cellule, studiare la motilità cellulare, studiare le interazioni cellula-cellula, quantificare l'attività dei farmaci ecc. quindi testare una prima versione di bio sensore. Nella **terza** fase cioè quella più specifica inerente la diagnostica delle diverse strutture virali e/o tumorali identificabili..., si potrà avere una maggiore esplicazione della espressione e/o identificazione virale ad esempio sulle ipoacusie neurosensoriali improvvise o tumorali della Testa/collo. La **quarta** fase si basa sulla ulteriore ottimizzazione del readout elettronico del Trasduttore Bio-FEVI e la identificazione di nuovi miRNA specifici di alcune specie tumorali prima di giungere alla fase di Release to Manufacturing del Bio-FEVI ed il rilascio della pubblicazione scientifica inerente questa innovativa strumentazione per la diagnosi medica.

Descrizione Prodotto

Il Bio-FinFETs EISDAC-VI (Bio-FEVI) è un dispositivo medico sperimentale, le schede elettroniche insieme ai Biosensori costituiscono il readout *BioFEVI Transducer*, core del sistema. Per la prima fase di validazione della ricerca e quindi del prototipo Bio-FEVI, verrà impiegato materiale biologico quale elemento selettivo per il Biosensore che potrà avere terminazioni di tipo Antibody, Aptamer, ssDNA o miRNA funzionale. A supporto della prima fase di Test, verranno customizzati anche sistemi software e hardware necessari alla simulazione di Aptameri funzionali, interazione Antibody-Biomarke ecc., per avere una prima risposta simulata della reale funzionalità del biosensore. Successivamente alla riuscita della fase di Start-up verrà attivata una seconda fase mirata all'obiettivo dell'intero progetto che solo parzialmente possiamo definire come la identificazione di specie virali e oncologiche, neoplastiche.

Vedere l'analisi funzionale e tecnica per una descrizione completa del *BioFEVI Transducer*.

Uso previsto del Prodotto

Bio-FinFETs EISDAC-VI (Bio-FEVI) è un dispositivo medico sperimentale che deve essere utilizzato nella identificazione e correlazione di specifici micro RNA rilevabili in tempo reale dal dispositivo il quale darà una precisa risposta in seno alla formazione di cellule pre-oncogene quindi di intercettare il possibile sviluppo di uno specifico tipo di tumore.

Acquisizione del Prodotto

Il Bio-FinFETs EISDAC-VI (Bio-FEVI) è un dispositivo medico sperimentale attualmente non in vendita e fino a quando non verranno superati tutti i test di affidabilità richiesti dai certificatori nazionali e internazionali per essere inserito nella lista dei dispositivi medici per uso diagnostico da laboratorio. La sua applicazione in contesto clinico ospedaliero sarà quella di dare una risposta in tempo reale e a basso costo (mutuabile) dello stato di salute del paziente o comunque di tutte quelle persone che vogliono sia direttamente che indirettamente mediante semplice check-up, conoscere la propria condizione fisica sotto il profilo delle possibili malattie di tipo virale come anche agenti esterni tossici per l'uomo che molto spesso portano ad un malfunzionamento o alterazione della funzionalità cellulare la quale subisce mutazioni dovute alla specifica alterazione genetica provocando nella peggiore dei casi, il cancro non facilmente diagnosticabile se non con screening mirati e ad alto costo per il fruitore finale.

Potenziali benefici e rischi per i soggetti

Durante lo screening dei soggetti e la produzione, il centro di ricerca compirà ogni sforzo per prevenire la diffusione di malattie trasmissibili. L'unità D.A.I. Head-Neck eseguirà lo screening dei soggetti, la determinazione dell'idoneità, il trattamento asettico e l'obiettivo primario del D.A.I. Head-Neck è massimizzare la sicurezza del soggetto. Per raggiungere questo obiettivo, il D.A.I. Head-Neck impiegherà uno screening rigoroso dei soggetti e test di laboratorio per ridurre il rischio di trasmissione di malattie trasmissibili. Lo screening dei soggetti include, ma non si limita a, la revisione delle eventuali cartelle cliniche pertinenti, compresa un'intervista di valutazione anche del rischio del soggetto attuale, un esame fisico del soggetto, i risultati dei test di laboratorio, nonché altre informazioni relative ai fattori di rischio per le malattie trasmissibili pertinenti. la sterilizzazione terminale per tutti i soggetti e i prodotti tissutali, biologici in generale. I campioni di sangue e/o tessuti dei soggetti prelevati saranno analizzati per i seguenti aspetti:

- Anticorpo del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) di tipo 1 e di tipo 2;
- Virus T-linfotropico umano (HTLV) Anticorpo di tipo I e di tipo II;

- Anticorpo per l'epatite C (HCV);
- Antigene di superficie per l'epatite B (HBsAg);
- Anticorpo totale per l'epatite B (HBcAb);
- Reazione rapida al plasma (RPR) per la sifilide o test sierologico per la sifilide (STS) Virus di immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) Test dell'acido nucleico;
- Virus dell'epatite C (HCV) Test dell'acido nucleico;
- Virus dell'epatite B (HBV) Test dell'acido nucleico;
- Anticorpo del citomegalovirus (CMV Total Ab).

Metodi:

Studio di Design

Lo studio cieco che coinvolge duecentodieci (210 soggetti sottoposti a Stapedectomia e cocleasacculotomia sarà posto in tre gruppi randomizzati. Un gruppo di controllo di settanta soggetti subirà una tipica Stapedectomia è comunemente eseguita per i pazienti con otosclerosi, una causa di CHL, altri settanta subiranno una cocleasacculotomia, indicato per i pazienti con MD refrattario (SNHL) che hanno un udito residuo minimo o nullo nell'orecchio interessato, gli altri settanta saranno sottoposti a screening prognostici da prelievo perilinfatico con metodo proposto di RWM "Tap" utilizzando un approccio transcanale standard con successiva elaborazione dei dati a mezzo *machine learning algorithms* utilizzati su profili perilinfatici dei miRNA per delineare tra SNHL e CHL e la possibilità di prevedere l'udito residuo dopo il CI con precisione del 100%.

Durante la fase di Profilazione dei soggetti verrà condotto uno studio di proteomica valutando l'espressione dei miRNA per predire lo stato della segnalazione delle *neurotrophins* nei soggetti con impianto cocleare.

In sintesi, possiamo ricavare una grande quantità di informazioni da un campione di perilinfato, compresi i detti predittori di perdita dell'udito, i marcatori di uno stato pro-infiammatorio, i fattori previsti per proteggere l'orecchio interno durante la chirurgia e i potenziali predittori dei risultati dell'impianto cocleare. Identificare i meccanismi della perdita dell'udito in **tempo reale** permetterà anche di ottimizzare l'**intervento farmacologico**. Per trarre vantaggio da questa ricchezza di dati, queste informazioni devono essere disponibili prima di iniziare un trattamento pianificato come l'IC.

L'apertura dell'orecchio interno è stata storicamente considerata impossibile a causa del rischio di perdita dell'udito; tuttavia, la recente esperienza con l'impianto cocleare per la conservazione dell'udito e studi di campionamento precedenti su soggetti con stapedectomia indicano che è possibile manipolare l'orecchio interno senza o con una perdita minima di udito residuo nella maggior parte dei soggetti. Proponiamo che la perilinfata possa essere campionata come una procedura **stand-alone**.

Popolazione di studio e criteri di selezione

Tutti gli aspetti dello studio e dei moduli di consenso saranno approvati dall'IRB prima dell'attuazione. Tutti i partecipanti richiederanno il pieno consenso informato, saranno disposti e in grado di soddisfare tutti i requisiti di studio e soddisferanno i seguenti criteri: maschi o femmine di età compresa tra i 18 e i 70 anni (inclusi), deve essere ambulatoriale con SNHL con CI e Schwannomi (Neurinomi), Soggetti con SNHL idiopatico monolaterale, con malattia di Meniere, SNHL subtypes, Soggetti con OMCC e OMC, Soggetti con malattie metaboliche complesse e oltre, Soggetti con malattie immunomediate di tipo 2.

I soggetti saranno esclusi dallo studio in base ai seguenti criteri:

- Ipertensione grave (pressione sanguigna sistolica maggiore o uguale a 200 mm Hg o pressione sanguigna diastolica maggiore o uguale a 182 mm Hg);
- Storia di malattia vascolare o anemia falciforme;

- Malformazioni della coclea: una coclea ossificata o addirittura non completamente formata non permette il corretto inserimento della componente interna multielettrodo;
- Patologie o malformazioni a carico del nervo acustico: la sua mancanza o una sua interruzione durante il suo tragitto verso il cervello, secondaria a neurinomi o difetti congeniti, causerebbe un ovvio fallimento terapeutico;
- Sindromi in cui si ha una ridotta capacità intellettiva: non sarebbe possibile attuare il protocollo terapeutico indispensabile alla buona riuscita riabilitativo/abilitativa;
- Ipoacusie che traggono giovamento dall'applicazione di protesi acustiche;
- Il soggetto non fornisce il pieno consenso;
- Il soggetto è coinvolto in un risarcimento del lavoratore, lesioni personali, o altre questioni legali relative alla sua salute.

Metodi di reclutamento

I soggetti saranno identificati attraverso i pazienti esistenti del D.A.I. Head-Neck, otorhinolaryngology's Unit, University Polyclinic Umberto 1° Rome così come attraverso i riferimenti dei medici. Lo sperimentatore primario, il Dr. Attanasio e i suoi partner (co-investigatori) eseguiranno le procedure di prelievo delle perilinfie, biopsie indirette e ICs per entrambi i gruppi di controllo e di trattamento. Questo studio sarà elencato su www.biofevi.weebly.com

Raccolta dei dati e reporting

I dati saranno raccolti nei seguenti punti: Immediatamente prima della Stapedectomy, cocleosacculotomia e RWM "Tap", 1, 2, 3, 6, 12 e 24 mesi dopo la Stapedectomy, cocleosacculotomia e RWM "Tap". I dati saranno raccolti utilizzando CDD Vault, 20-Item Short Form Survey (SF-20) e valutando il tasso di recupero funzionale. Il CDD-SHDI è un questionario di 9 punti usato per quantificare la disabilità dovuta al dolore e squilibri motori. L'SF20 è un questionario di 1 pagina e 20 voci che esamina l'auto-percezione dei pazienti sulla salute e qualsiasi cambiamento nella capacità di svolgere attività quotidiane. I dati di base saranno raccolti in clinica prima dell'intervento, i dati di follow-up saranno raccolti tramite il sistema CDD Vault (su modello CDD-EBPRO (Compatibile con software OBERD)), le indagini via e-mail/telefoniche e/o le visite in ufficio. Le risposte raccolte ad ogni punto temporale includeranno i dati CDD-SHDI e SF-20 e saranno confrontati con i punteggi CDD-VD e SF-20 di base riportati appena prima della Stapedectomy, cocleosacculotomia e RWM "Tap". I dati dello studio saranno conservati per due (2) anni dopo la data in cui l'indagine è completata, terminata o fino a quando le registrazioni non sono più necessarie per sostenere il protocollo, qualunque sia la data successiva. La custodia dei registri può essere trasferita. I registri e i dati dei pazienti possono essere ispezionati e/o copiati dalle autorità di regolamentazione applicabili. Una descrizione di questo studio clinico sarà disponibile su <https://www.biofevi.weebly.com>. Questo sito web non includerà informazioni che possano identificare i soggetti. Al massimo, il sito web includerà un riassunto dei risultati. È possibile effettuare ricerche in questo sito web in qualsiasi momento.

Risultati attesi

Lo sponsor si aspetta che le valutazioni a breve e a medio termine dell'applicazione di BioFEVI mostrino un feedback positivo dei risultati dei pazienti rispetto ai tradizionali piani di cura della Stapedectomy, cocleosacculotomia e prevenzione su base RWM "Tap" nella valutazione virale, pre-oncogenica, neoplastica. Ci si aspettano miglioramenti sia nell'CDD-SHDI Sensory Hypoacusis Disability Index che nel punteggio SF-20 dal gruppo di trattamento rispetto al gruppo di controllo. L'interpretazione dei dati e la significatività statistica dei risultati saranno descritti più avanti in questo protocollo.

Reazioni avverse

Non ci si aspetta alcun esito o reazione avversa a causa di un paziente trattato con BioFEVI. I biosensori utilizzati in biofevi non possono in alcun modo produrre un evento avverso (AE) anche qualora si trattasse di biosensori di profondità a bioimpedenza. Tutti i partecipanti avranno accesso alle informazioni di contatto del PI o dei co-investigatori che eseguono la loro Stapedectomy, cocleossacculotomia e RWM "Tap". Qualsiasi reazione avversa deve essere segnalata immediatamente al PI o ai co-investigatori.

Motivi per il ritiro o l'interruzione

Un soggetto può essere interrotto dallo studio in qualsiasi momento se il soggetto, lo Sperimentatore o lo Sponsor ritengono che non sia nell'interesse del soggetto continuare.

La seguente è una lista di possibili ragioni per l'interruzione del trattamento dello studio:

- Fallimento dello screening;
- Ritiro del consenso da parte del soggetto;
- Il soggetto non è conforme alle procedure dello studio;
- Evento avverso che, secondo l'opinione dello sperimentatore, sarebbe nell'interesse del soggetto interrompere la partecipazione allo studio;
- Violazione del protocollo che richiede l'interruzione;
- Perso al follow-up;
- Richiesta dello sponsor per l'interruzione anticipata dello studio;
- Morte del soggetto;

Tutti i soggetti sono liberi di ritirarsi dalla partecipazione in qualsiasi momento, per qualsiasi motivo, specificato o non specificato, e senza pregiudizio. Tentativi ragionevoli saranno fatti dallo Investigatore di fornire una ragione per il ritiro del soggetto. Il motivo del ritiro del soggetto dallo studio sarà specificato nei documenti di origine del soggetto e nel Case Report Form (CRF). Se un soggetto viene ritirato dal trattamento a causa di un AE (evento avverso), il soggetto sarà seguito e trattato dallo sperimentatore fino a quando il parametro anormale o il sintomo si è risolto o stabilizzato. Lo sperimentatore deve fare ogni sforzo per contattare i soggetti che hanno perso il follow-up. I tentativi di contattare tali soggetti devono essere documentati nella documentazione del soggetto (ad esempio, orari e date del tentato contatto telefonico, ricevuta di invio di una lettera raccomandata, ecc.)

Gestione dei ritiri dei partecipanti alla cessazione dello studio:

Anche se i soggetti possono ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento e per qualsiasi motivo (o possono essere ritirati a discrezione dello sperimentatore), il ritiro del soggetto deve essere evitato quanto ragionevolmente possibile. In ogni caso, il follow-up appropriato per gli endpoint deve essere continuato. I soggetti che si ritirano prematuramente non devono essere sostituiti. Per soggetti considerati persi al follow-up, la CRF deve essere completata fino all'ultima visita effettuata.

Conclusione prematura o sospensione dello studio:

Questo studio può essere temporaneamente sospeso o terminato prematuramente se c'è un sufficiente ragionevole motivo. La notifica scritta, che documenta il motivo della sospensione o della cessazione, sarà fornita dalla parte che sospende o termina lo studio allo sperimentatore, allo Sponsor e all'Institutional Review Board (IRB), a seconda dei casi. Se lo studio viene interrotto o sospeso prematuramente, lo sperimentatore informerà

prontamente l'IRB e fornirà i motivi della cessazione o della sospensione. Circostanze che possono giustificare l'interruzione o la sospensione includono, ma non si limitano a:

- Determinazione di un rischio inaspettato, significativo o inaccettabile per i partecipanti;
- Dimostrazione di efficacia che giustificherebbe l'interruzione;
- Insufficiente conformità ai requisiti del protocollo;
- Dati che non sono sufficientemente completi e/o valutabili;
- Determinazione di futilità.

Lo studio può riprendere una volta che le preoccupazioni sulla sicurezza, la conformità al protocollo, la qualità dei dati sono affrontate e soddisfatte dallo Sponsor e/o dall'IRB.

Metodi e programma di studio:

I soggetti idonei allo studio esamineranno e si sottoporranno al consenso informato. Una volta acconsentito, i soggetti saranno assegnati in modo casuale su una base 1:1 a subire:

- Gruppo di trattamento, cieco: Stapedectomy o cocleossacculotomia su causa CHL o MD refrattario;
- Gruppo di controllo, cieco: Attuale standard di cura dopo una Stapedectomy o cocleossacculotomia che verrà sostituito dopo approvazione fine sperimentazione BioFEVI dal nuovo standard attinente al protocollo farmacologico mirato FBDD.

Visita di riferimento/screening (dal giorno -61° al -1° dal giorno 0)

Le seguenti procedure saranno eseguite alla visita di riferimento/selezione:

- Rivedere lo studio con il soggetto e ottenere il consenso informato scritto e Standard (HIPAA) di autorizzazione;
- Assegnare al soggetto un numero unico di screening/iscrizione;
- Esaminare e registrare l'anamnesi medica, l'anamnesi chirurgica e l'anamnesi dei farmaci per determinare l'idoneità in base ai criteri di inclusione/esclusione;
- Se il paziente ha una storia di fumo e indica di aver smesso di recente (nelle ultime 6 anni dallo screening);
- Registrare i dati demografici (età, razza, etnia, sesso);
- Documentare i parametri vitali;
- Documentare tutti i farmaci attuali, compresi i farmaci da banco e farmaci a base di erbe;
- Eseguire l'esame fisico;
- Somministrare CDD-SHDI e SF-20.

Visita di trattamento (giorno 0)

Le seguenti procedure saranno eseguite il giorno del trattamento di Stapedectomy o cocleossacculotomia prima del trattamento se non sono state completate alla visita di screening o se il trattamento avviene più di 2 settimane dopo la visita di screening:

- Somministrare CDD-SHDI e SF-20.

Le procedure per la Stapedectomy o cocleossacculotomia e l'anestesia devono avvenire secondo i protocolli clinici/ospedalieri standard;

La randomizzazione dei soggetti qualificati sarà incorporata nel sistema CDD-EBPRO (Compatibile con software OBERD) una volta che paziente si presenta alla clinica per il trattamento e tutte le inclusioni/esclusioni sono confermate.

Le seguenti tecniche standard di cura saranno utilizzate in base al braccio in cui il paziente è randomizzato:

Gruppo di controllo (cieco):

Il gruppo di controllo di settanta (70) membri sarà sottoposto alla tipica Stapedectomy o cocleosacculotomia di trattamento e prelievi.

Gruppo di trattamento (cieco):

Il gruppo di trattamento di settanta (70) membri sarà sottoposto alla tipica Stapedectomy o cocleosacculotomia di trattamento con campionamento descritto al punto Metodi Studio di Design.

Le seguenti procedure saranno eseguite il giorno del trattamento, dopo il trattamento:

- Valutare gli eventi avversi;
- Fornire al soggetto le istruzioni post-operatorie da portare a casa.

Visite di follow-up

Dopo la dimissione dall'ospedale, il follow-up clinico avverrà nei seguenti momenti: 1, 2, 3, 6, 12 e 24 mesi o in qualsiasi momento in cui il soggetto o l'operatore sanitario ritiene che si sia verificato un evento avverso. I pazienti avranno un periodo di riposo di 14 giorni dopo ogni termine di tempo per completare le indagini di follow-up CDD-SHDI e SF-20. I sondaggi non completati in questo tempo non saranno inclusi nel set di dati finale per fornire un quadro più chiaro dei dati raccolti da ogni punto temporale.

Le seguenti procedure saranno eseguite in tutte le visite di follow-up, se non diversamente indicato:

- Valutare gli eventi avversi;
- Valutare le complicazioni in seguito ai trattamenti e correlazione scampionamento;
- Documentare tutti i farmaci attuali, compresi i farmaci da banco e farmaci a base di erbe;
- Eseguire l'esame fisico;
- Somministrare CDD-SHDI e SF-20;
- Valutare i livelli di espressione CHL o MD recidivanti su eventuale base a trattamento *farmacologico mirato FBDD*.

Visita finale dello studio

Le seguenti procedure saranno eseguite alla visita finale post-trattamento:

- Valutare gli eventi avversi;
- Valutare le complicazioni in seguito ai trattamenti farmacologici mirati;
- Documentare tutti i farmaci attuali, compresi i farmaci da banco e farmaci a base di erbe;
- Eseguire un esame fisico;
- Somministrare CDD-SHDI e SF-20.

Visita non programmata

Le seguenti procedure saranno eseguite se il soggetto si presenta alla clinica in qualsiasi altro punto temporale non specificato sopra:

- Valutare gli eventi avversi;
- Valutare le complicazioni in seguito ai trattamenti
- Documentare tutti i farmaci attuali, compresi i farmaci da banco e farmaci a base di erbe;
- Eseguire un esame fisico;

Cessazione anticipata

Tutti i soggetti hanno il diritto di ritirarsi dalla partecipazione allo studio in qualsiasi momento durante lo studio. Se, per qualsiasi motivo, un soggetto si ritira dallo studio, sarà eseguita una visita di interruzione anticipata.

Le seguenti procedure saranno eseguite (se il soggetto è d'accordo) alla visita di fine anticipata.

Visita di cessazione anticipata:

- Valutazione degli eventi avversi;
- Valutare le complicazioni in seguito ai trattamenti;
- Documentare tutti i farmaci attuali, compresi i farmaci da banco e farmaci a base di erbe;
- Eseguire un esame fisico;
- Somministrare CDD-SHDI e SF-20.

RANDOMIZZAZIONE

I soggetti che soddisfano tutti i criteri di inclusione ed esclusione saranno randomizzati il giorno del trattamento in un rapporto 1:1 al gruppo di trattamento o al gruppo di controllo, in conformità secondo un programma generato al computer preparato da un **biostatistico**. Il programma di randomizzazione sarà incorporato nel sistema CDD-EBPRO (Compatibile con software OBERD). La randomizzazione sarà quindi eseguita dal personale dello studio direttamente nel sistema CDD-EBPRO (Compatibile con software OBERD). Il personale dello studio sarà istruito a non randomizzare fino a quando non sarà stato confermato che il soggetto soddisfa tutti i criteri di inclusione/esclusione il giorno del trattamento.

GIUSTIFICAZIONE DELLA DIMENSIONE DEL CAMPIONE

Calcoli della dimensione del campione

I seguenti tassi di errore di tipo I e i limiti di decisione per lo studio sono specificati:

- i risultati primari sono i punteggi CDD-SHDI e SF-20
- ipotesi nulla: $\mu_{\text{BioFevi}} = \mu_{\text{SOC}}$
- tasso di errore di tipo I: $\alpha=0.05$
- rapporto di campionamento: $\kappa=1$
- dimensione dell'effetto: 0,45

Power analysis

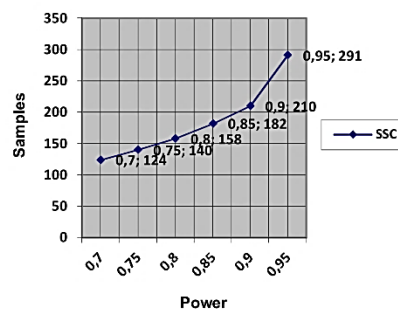
	Power, 1-β*					
	0.70	0.75	0.80	0.85	0.91	0.95
Sample Size	124	140	158	182	210	291

*La potenza, 1-β, è definita come la probabilità di rilevare correttamente un effetto quando esiste un effetto.

Quando la potenza è alta, la probabilità di errore di tipo II (cioè concludere che non c'è alcun effetto quando esiste un effetto) scende.

Perdita al follow-up

La possibilità di perdita al follow-up a 12 mesi post-operatorio è moderata e può essere assunta al 15%, adeguando il calcolo della dimensione del campione all'85% della potenza a $n=182+28=210$.

Simple Size Calculatios**Randomizzazione**

La dimensione del campione è stata calcolata sulla base dell'ipotesi nulla ($H_0: \mu_{\text{Bio-Fevi}} = \mu_{\text{USOC}}$).

L'utilizzo della *machine learning algorithms* su profili perilinfatici dei miRNA per delineare tra SNHL e CHL e la possibilità di prevedere l'udito residuo dopo il CI con precisione del 100% dimostra un chiaro vantaggio per i soggetti, anche valutando l'espressione dei miRNA per predire lo stato della segnalazione delle *neurotrofine* nei soggetti con impianto cocleare.

Per un modello a dimensione fissa del campione, la dimensione del campione necessaria per raggiungere una potenza di $1-\beta=0,85\%$ per un t-test a due facce a livello $\alpha=0,05$ sotto questi presupposti ammonta a un totale di 182 pazienti, o 60,6 pazienti in ogni gruppo di trattamento. Questo calcolo fornisce anche una potenza adeguata per test chi-quadro di equivalenza a due facce dei risultati secondari tra i gruppi di trattamento.

Poiché i risultati dello studio per l'end-point primario sono disponibili 1 anni dopo il trattamento, il tasso di abbandono dovrebbe essere abbastanza moderato. Una potenziale diluizione dell'effetto del trattamento dovuta a drop-out è preso in considerazione (ad esempio la perdita al follow-up); si presume che questo possa essere compensata da un ulteriore 15% di pazienti da arruolare, e quindi la dimensione totale del campione

richiesta per un disegno a dimensione fissa del campione è $n=182+28=210$ pazienti, o 70 pazienti in ogni gruppo di trattamento.

PIANO DI ANALISI STATISTICA*Endpoint primario*

Dolore localizzato area di interesse come misurato dall'indice di disabilità CDD-SHDI e SF-20

Breve forma di indagine (SF20)

Punti finali secondari

Tasso di reintervento (quando possibile).

Tutte le analisi saranno eseguite utilizzando la popolazione per-protocollo e la popolazione intention-to-treat popolazione (per includere i soggetti che sono ritirati prematuramente o randomizzati ma non trattati per gruppo di randomizzazione).

VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA

Gli eventi avversi (AE) saranno monitorati e raccolti dal team dello studio dal punto di consenso firmato fino a 7 (per gli AE non gravi) o 30 giorni (per gli SAE) dopo l'ultimo giorno di partecipazione allo studio. Per ogni AE, una spiegazione dettagliata sarà ottenuta dal soggetto e dalla cartella clinica del soggetto. Tutti gli AE saranno registrati sulle CRF.

Definizione di evento avverso

Un evento avverso è definito come qualsiasi evento medico non previsto, indipendentemente dalla relazione tra il gruppo sperimentale della sperimentazione. Un AE può essere qualsiasi fenomeno non voluto, **anomalia di laboratorio**, sintomo, o malattia associata alla sperimentazione. Qualsiasi anomalia che si presenta durante un test medico deve essere definita come un AE se produce segni e/o sintomi clinici, richiede un intervento o è ritenuta clinicamente significativa dallo sperimentatore.

Definizione di evento avverso grave

Un evento avverso è considerato grave se risulta in uno dei seguenti casi:

1. Morte;
2. Un evento avverso pericoloso per la vita;
3. Richiede un ricovero ospedaliero o prolunga il ricovero esistente;
4. Disabilità/incapacità persistente;
5. Evento importante dal punto di vista medico per lo sperimentatore.

Definizione di effetto avverso imprevisto del dispositivo (EAID)

L'effetto avverso imprevisto del dispositivo è qualsiasi effetto avverso grave sulla salute o sulla sicurezza, qualsiasi problema che metta in pericolo la vita o il decesso causato da, o associato a, un dispositivo, se tale un dispositivo, se tale effetto, problema o morte non è stato precedentemente identificato in natura, gravità o grado di incidenza nella domanda; o qualsiasi altro problema grave non previsto associato a un dispositivo che riguarda i diritti, la sicurezza o il benessere dei soggetti.

Gravità dell'evento

Allo sperimentatore verrà chiesto di valutare la gravità dell'AE utilizzando le seguenti categorie:

Lieve: Gli eventi richiedono un trattamento minimo o nullo e non interferiscono con le attività quotidiane del partecipante.

Moderato: Gli eventi comportano un basso livello di disagio o preoccupazione per le misure terapeutiche. Gli eventi moderati possono causare qualche interferenza con il comportamento.

Grave: Gli eventi interrompono l'abituale attività quotidiana di un partecipante e possono richiedere una terapia farmacologica sistemica o altri trattamenti. Gli eventi gravi sono di solito potenzialmente pericolosi per la vita o inabilitanti.

Relazione con i prodotti dello studio

Per tutti gli AE raccolti, il medico che esamina e valuta il partecipante determinare la causalità dell'AE in base alla relazione temporale e al suo giudizio clinico. Il grado di certezza sulla causalità sarà valutato utilizzando le categorie di seguito.

Certezza: La relazione tra l'AE e il dispositivo o la procedura dello studio può essere stabilita con certezza.

Probabilmente: Mentre una chiara relazione con il dispositivo o la procedura di studio non può essere stabilita, l'AE è associato ad un AE atteso o non ci sono altre condizioni mediche o interventi che potrebbero spiegare il verificarsi di tale evento.

Possibile: Non c'è una chiara relazione tra l'AE e il dispositivo o la procedura di studio; tuttavia, non si può concludere definitivamente che non c'è nessuna relazione.

Non correlato: Non c'è relazione tra l'AE e il dispositivo o la procedura di studio. Questo può includere, ma non è limitato a, che l'incidente sia un risultato atteso di una malattia precedentemente esistente o concomitante, un farmaco concomitante o una procedura che il soggetto ha sperimentato.

Attendibilità

Lo sperimentatore sarà responsabile di determinare se un AE è atteso o inatteso. Un AE sarà considerato inatteso se la natura, la gravità o la frequenza dell'evento non è coerente con le informazioni sul rischio precedentemente descritte per i prodotti dello studio.

Periodo di tempo e frequenza per la valutazione degli eventi e il follow-up

L'investigatore privato registrerà tutti gli eventi segnalabili con data di inizio che si verificano in qualsiasi momento dopo ottenuto il consenso informato fino a 7 (per gli AE non gravi) o 30 giorni (per gli SAE) dopo l'ultimo giorno di partecipazione allo studio. Ad ogni visita dello studio, lo sperimentatore chiederà informazioni su il verificarsi di AE/SAE dall'ultima visita. Gli eventi saranno seguiti per l'esito fino alla risoluzione o alla stabilizzazione.

Segnalazione di SAE

In caso di SAE, lo sperimentatore deve informare lo sponsor entro 1 giorno lavorativo dopo lo sperimentatore viene a conoscenza dell'evento. Anche l'IRB deve essere notificato secondo le loro politiche di notifica.

Segnalazione EAID

Nel caso di una EAID, l'investigatore dello studio deve notificare lo Sponsor e l'IRB di revisione il più presto possibile, ma in nessun caso più tardi di 10 giorni lavorativi dopo la notifica.

IRB il più presto possibile, ma in nessun caso più tardi di 10 giorni lavorativi dopo che il ricercatore è venuto a conoscenza dell'effetto. Lo Sponsor dello studio è responsabile della conduzione di una valutazione di un EAID e deve riportare i risultati di tale valutazione all'IRB di revisione e allo sperimentatore entro 10 giorni lavorativi dal momento in cui lo sponsor riceve per la prima volta la notizia dell'effetto.

Gravidanza

Se un soggetto di sesso femminile rimane incinta durante lo studio, deve essere seguito fino a quando risultato della gravidanza. L'esito della gravidanza deve essere riportato allo sponsor sull'appropriato AE CRF.

Monitoraggio della sicurezza dei dati

Poiché i trattamenti e le tecniche chirurgiche sono attualmente utilizzati come standard di cura, il team dello studio non prevede che i soggetti sperimentino eventi avversi unicamente a causa della partecipazione allo studio. Questa è semplicemente una proposta per randomizzare formalmente e seguire soggetti sottoposti alle procedure comunemente eseguite, le quali sono state dimostrate di essere sicure e approvate. Pertanto, un comitato formale di monitoraggio della sicurezza dei dati non sarà necessario per questo studio.

MONITORAGGIO DEI DATI

Lo sperimentatore principale sarà responsabile di assicurare che lo studio sia condotto in secondo il protocollo, la Buona Pratica Clinica (GCP), i requisiti normativi applicabili e che i dati registrati siano validi. Per raggiungere questo obiettivo, lo studio sarà continuamente monitorato e rivisto su base mensile dal team dello studio.

Il monitoraggio del sito clinico viene condotto per garantire che i diritti e il benessere dei soggetti umani siano protetti, che i dati dello studio riportati siano accurati, completi e verificabili, e che lo svolgimento della sperimentazione sia conforme al protocollo/modifiche attualmente approvato protocollo/modifiche, con la GCP e con le disposizioni normative applicabili.

Un Piano di Monitoraggio Clinico sarà creato dallo Sponsor e descriverà in dettaglio chi il monitoraggio, con quale frequenza il monitoraggio sarà fatto, a quale livello di dettaglio del monitoraggio e la distribuzione dei rapporti di monitoraggio.

TRATTAMENTO DEI DATI E CONSERVAZIONE DELLA DOCUMENTAZIONE

La raccolta di informazioni personali sui pazienti sarà limitata alla quantità necessaria per raggiungere gli obiettivi della ricerca, in modo che non vengano raccolte informazioni sensibili non necessarie.

Solo il personale dello studio raccoglierà i dati. I documenti cartacei saranno conservati per la durata dello studio fino all'inserimento dei dati. Tutti i documenti cartacei saranno conservati nell'ufficio del coordinatore della ricerca. L'inserimento dei dati sarà completato nel database sicuro CDD-EBPRO (che coprirà tutte le CRF create). I dati CDD-EBPRO saranno esportati in formato Excel o SAS (protetto da password), che sarà poi utilizzato per l'analisi dei dati. Solo i dati de-identificati saranno utilizzati per l'analisi dei dati. Tutti i documenti cartacei saranno distrutti entro cinque anni dal completamento dello studio, previa approvazione dello sponsor.

COMITATO DI REVISIONE ISTITUZIONALE

Il protocollo, i moduli di consenso informato e tutti i materiali dei partecipanti saranno sottoposti a all'IRB per la revisione e l'approvazione. L'approvazione del protocollo e del modulo di consenso deve essere ottenuta prima che qualsiasi partecipante venga arruolato. Qualsiasi modifica al protocollo richiederà la revisione e l'approvazione dell'IRB prima che i cambiamenti siano implementati nello studio. Tutte le modifiche al modulo di consenso devono essere approvate dall'IRB; verrà stabilito, sarà stabilito se i partecipanti che hanno dato il loro consenso in precedenza devono essere nuovamente autorizzati.

PROCESSO DI CONSENSO

I soggetti saranno avvicinati quando passano dalla clinica per essere valutati e considerati per la Stapedectomy e cocleasacculotomia per il dolore irradiato alla parte interessata. Ogni potenziale soggetto deve fornire un consenso scritto con piena conoscenza delle procedure coinvolte.

Il consenso informato, approvato dall'IRB e conforme alle linee guida normative linee guida, deve essere completamente spiegato dallo sperimentatore o da un membro dello staff dello studio compresi gli obiettivi dello studio, i metodi, i benefici e i rischi, e deve essere firmato dal soggetto prima dell'arruolamento nello studio. I potenziali soggetti saranno informati che la partecipazione allo studio è volontaria e che possono ritirarsi in qualsiasi momento. Ai soggetti verrà detto che la scelta di non partecipare non influenzerà l'assistenza ricevuta per il trattamento. I soggetti saranno informati che autorizzeranno l'accesso dello staff dello studio a cartelle cliniche riservate. Il soggetto avrà tempo sufficiente per leggere il consenso e porre eventuali domande. Una volta firmato il consenso informato, al soggetto verrà una copia del documento.

DEVIAZIONE DEL PROTOCOLLO

Una deviazione dal protocollo e qualsiasi inosservanza del protocollo di sperimentazione clinica o dei requisiti della GCP requisiti. L'inosservanza può essere da parte del partecipante, dello sperimentatore o del personale del sito dello studio. Come risultato delle deviazioni, le azioni correttive devono essere sviluppate dal sito e implementate prontamente.

Tutte le deviazioni/violazioni del protocollo devono essere documentate utilizzando il Protocollo CRF delle deviazioni/violazioni del protocollo e presentate all'IRB secondo le loro linee guida.

LEGGI E REGOLAMENTI

Questo studio clinico sarà condotto in conformità con tutte le leggi e i regolamenti nazionali dei paesi in cui viene eseguito lo studio clinico, così come tutte le linee guida applicabili.

linee guida applicabili. Lo studio sarà registrato su www.clintrials.gov e su altri siti, come appropriato.

POLITICA DI PUBBLICAZIONE E CONDIVISIONE DEI DATI

La preparazione e la presentazione per la pubblicazione di manoscritti contenenti i risultati dello studio risultati dello studio devono essere in accordo con un processo stabilito di comune accordo scritto tra lo Sponsor dello studio e le istituzioni partecipanti. La pubblicazione o la presentazione dei risultati dello studio deve essere conforme a tutte le leggi applicabili sulla privacy, incluso, ma non limitato all'Health Insurance Portability and Accountability Act del 1996.

PERSONALE E RUOLI DELLO STUDIO

Giuseppe A., Carlo C.	Principale Investigatore (Medico, Genomico)	Responsabile di tutte le questioni relative allo studio
Valeriano B., Ferruccio R.	Principale Investigatore (Elettrochimico, Genomico)	Responsabile di tutte le questioni relative allo studio
	Co-Investigatori	Raccolta dei dati; selezione, consenso e follow-up con i soggetti
	Responsabile del progetto	Gestione e analisi dei dati; affronta le questioni dell'IRB; e comunica con l'IRB
	Study Coordinator	Raccolta dei dati; screening, consenso, randomizzare e seguire i soggetti
	Statistico / Data Manager	Gestione e analisi dei dati

CONFLITTI DI INTERESSE

Non sono stati segnalati conflitti di interesse.

APPENDICE I

La sperimentazione sarà condotta in conformità secondo il codice dei regolamenti vigenti nel nostro paese applicabile agli studi clinici (Id.:_____)

Lo sperimentatore principale assicurerà che nessuna deviazione o modifica del protocollo avrà luogo senza il previo accordo da parte dello Sponsor e l'approvazione documentata da parte dell'Istituto di revisione, tranne quando necessario per eliminare un pericolo immediato per i partecipanti allo studio.

Tutto il personale coinvolto nella conduzione di questo studio ha completato l'addestramento sulla protezione dei soggetti umani.

Accetto di assicurarmi che tutti i membri dello staff coinvolti nella conduzione di questo studio siano informati dei loro obblighi nel rispettare gli impegni di cui sopra.

Firma del ricercatore principale (Medico, Genomico)	Date (mm/dd/yy)
Nome in stampatello	
Nome dell'istituzione	
Firma del ricercatore principale (Elettrochimico, Genomico)	Date (mm/dd/yy)
Nome in stampatello	
Nome dell'istituzione	

APPENDICE II

Programma di eventi:

Visita	Screening / linee di Base	Tratta- mento / Giorno 0	Mese 1	Mese 2	Mese 3	Mese 6	Mese 12	Mese 24	Termine Anticipato	Visita non pro- grammata
Finestra di visita	-30 giorni	-	+0 – 14 giorni	+0 – 14 giorni	+0 – 14 giorni	+0 – 14 giorni	+0 – 14 giorni	+0 – 14 giorni	-	-
Consenso informato										
Assegnare l'ID										
Medico/Sociale Sto- ria (incl. Demogra- fia, Ht, peso, BMI)										
Criteri di inclu- sione/esclusione										
Farmaci concomi- tanti										
Esame fisico (incl. temperatura, BP, FC)										
Randomizzazione										
AE / complicanze chirurgiche compli- cazioni raccolta										

1. Verrà raccolto solo lo stato di occupazione
 2. Da eseguire su soggetti con storia di diabete che non hanno un test HbA1c sierico eseguito entro 6 settimane prima dello screening
 3. I questionari devono essere somministrati PRIMA dell'intervento nel giorno del trattamento e dell'esame fisico alla visita di follow-up/termine anticipato
- Da eseguire se la cessazione anticipata avviene DOPO la visita di follow-up di 3 mesi

Abbreviations

miRNA	microRNA (<i>RNA non codificante a singolo filamento</i>)
SNHL	sensorineural hearing loss
CHL	conductive hearing loss
CI	cochlear implantation
OMCC	chronic otitis media with cholesteatoma
OMC	chronic otitis media
RWM	round window membrane
FBDD	fragment-based drug discovery (FBDD) approaches
IRB	Institutional review board (ethics committee)
CDD-SHDI	Sensory Hypoacusis Disability Index
SF-20	Short Form Survey Instrument (SF-20)
HIPAA	Health Insurance Portability and Accountability Act del 1996
CDD-EBPRO	evidence-based patient-reported outcomes (OBERD)
$\mu_{\text{BioFevi}} = \mu_{\text{SOC}}$	Valori medi dei campioni
SAE	serious adverse event
EAID	Definizione di effetto avverso imprevisto del dispositivo

4.1 Overview sul sistema di progetto elettronico

I sensori elettrochimici sono ampiamente utilizzati in molte applicazioni, come già detto per la diagnosi di malattie, monitoraggio ambientale e l'ispezione degli alimenti, grazie alla loro rapidità di analisi, all'elevata selettività, all'alta sensibilità e alla semplicità. Un sensore elettrochimico agisce come un trasduttore che converte la quantità chimica di analiti all'interno di una determinata soluzione in segnali elettrici. In generale, vengono generate due forme di segnale di uscita, ovvero il potenziale e la corrente, ognuno dei quali richiede un proprio circuito di lettura. I sensori elettrochimici amperometrici, che generano un segnale di corrente, utilizzano un potenziostato come circuito di interfaccia durante la raccolta dei segnali. I sensori elettrochimici potenziometrici, che generano un segnale di potenziale, utilizzano un circuito di interfaccia e generano un segnale di potenziale, utilizzano un amplificatore di operazionali come circuito di lettura. Per acquisire le informazioni del sensore e trasmettere i dati acquisiti è necessario un sistema di circuiti back-end. Di conseguenza, lo sviluppo di un sistema di traduzione per il rilevamento elettrochimico. Sono state condotte diverse ricerche per sviluppare un sistema portatile di Spettroscopia di Bio-Impedenza che utilizzi componenti discreti per applicazioni di sensori elettrochimici ecc. Ulteriori ricerche sono state dedicate allo sviluppo di un chip di lettura per una configurazione a transimpedenza ultrasensibile con livelli di input per la misura della corrente di bias pari a 1 femtoampere idoneo per applicazioni a trasduttore di tipo fotodiodo, tubo fotomoltiplicatore, spettrometria, cromatografia, e buffering/TIA ad alta impedenza per sensori chimici e sensori capacitativi.

Con il rapido sviluppo dell'industria dei semiconduttori, le tecnologie system-on-chip (SoC) hanno avuto un impatto sostanziale sull'integrazione dei sistemi. I requisiti delle applicazioni portatili includono basso consumo di energia, dimensioni compatte e comunicazione wireless. Per le applicazioni portatili e per offrire la libertà di mobilità degli utenti, questa ricerca presenta un sistema di Spettrometria di Bio-Impedenza ad alta integrazione con circuiti di lettura e un'unità di micro controllo ARM Cortex per applicazioni di sensori elettrochimici, amperometrici e potenziometrici, Label-free e Label-based. I circuiti di lettura, che comprendono un potenziostato e un amplificatore per applicazioni di Trans-Impedenza (TIA), sono stati implementati nel processo FinFETs da 10 nm. L'unità di micro controllo è stata implementata utilizzando un field programmable gate array (FPGA). Il sistema può visualizzare i dati acquisiti in tempo reale su un'interfaccia grafica (GUI) ed è abbastanza piccolo da essere portatile. Integrando i sensori elettrochimici con il sistema proposto, è possibile eseguire comodamente il rilevamento e studio degli analiti.

Per verificare lo sviluppo e la corretta funzionalità del sistema BioFEVI è stato eseguito un ciclo di test composto da tre prove come riportato nel GANTT di progetto, vedi figura 4.1.

Il resto del capitolo è organizzato come segue: la sezione 4.2 descrive il sistema di spettroscopia a bio-impedenza proposto; la sezione 4.3 illustra i risultati di misura del sistema proposto; infine, la sezione 4.4 riporta le conclusioni del lavoro.

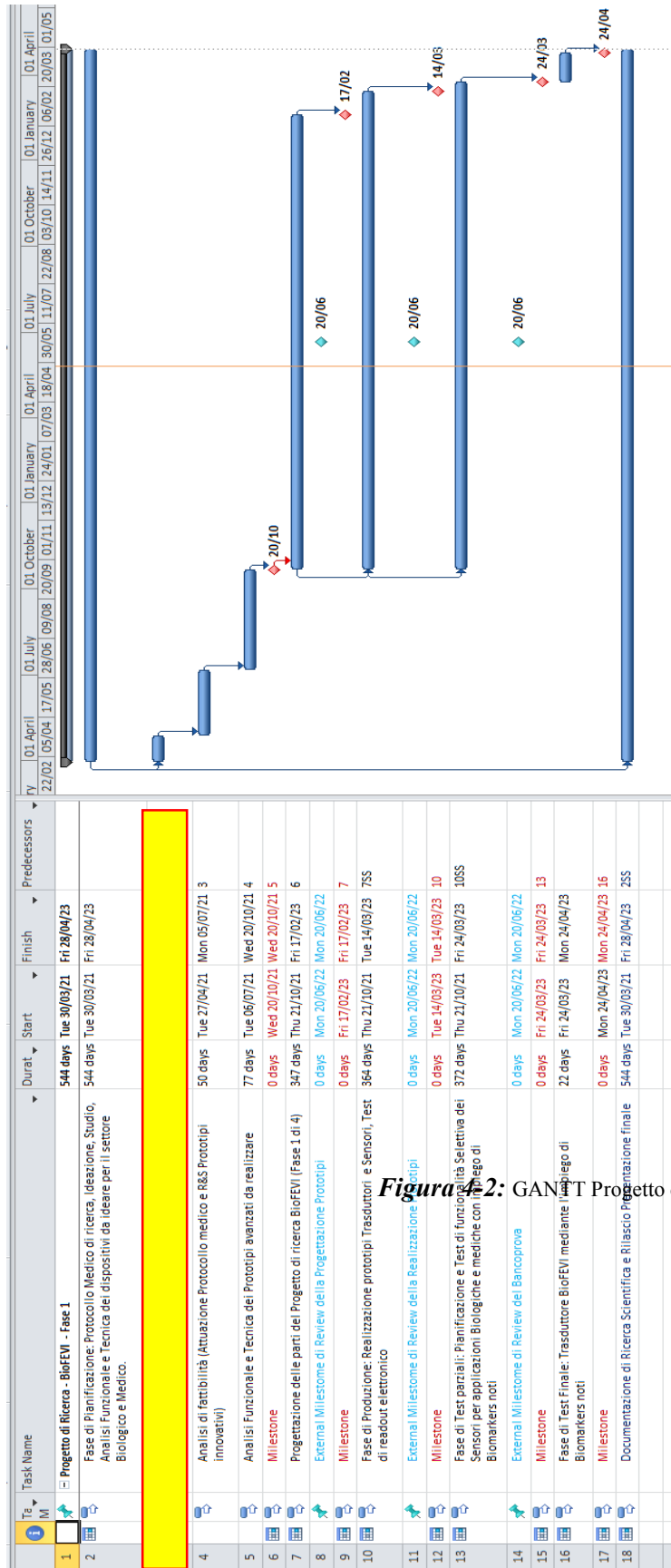


Figura 2: GANTT Progetto di ricerca realizzazione dispositivo BioFEVI

4.2 Sistema di spettroscopia a Bio-Impedenza BioFEVI

Il sistema prototipale BioFEVI proposto e illustrato nella figura 4.2 e 4.3, è composto da circuiti di lettura di Low Leakage Submodule (BEB4530-1SI), un Data acquisition (BF-DO0407SDPZ) composta da un convertitore $\Sigma\Delta$ analogico-digitale (ADC), una interfaccia opto-isolata SPI, un'unità di microcontrollo web server ARM Cortex (CompuBoard) con display incorporato, un modulo ricetrasmittitore a radiofrequenza (RF)/WiFi, una grafica GUI e un database relazionale SQL con protocollo Jason. La versione finale del sistema BioFEVI prevede l'upgrade hardware che si sostanzia nella implementazione di un circuito generatore di segnale programmabile DDS più un modulatore DAC collegato all'interfaccia del dispositivo sotto test (DUT) che a sua volta sarà collegato alla struttura terminale del circuito di lock-in sopra descritto e la ulteriore implementazione di un DFT a trasformata discreta di Fourier connesso ad una interfaccia seriale I²C per l'invio dei dati elaborati inerenti la parte Re e Im dei segnali elettrici provenienti dai sensori di DUT (questi ultimi aspetti inerenti la versione finale non verranno discussi in questa dissertazione).

La quantità chimica degli analiti viene convertita in segnali elettrici dai sensori elettrochimici, amperometrici e potenziometrici, Label-free e Label-based del sistema.

I segnali elettrici vengono amplificati e convertiti in forma digitale dal circuito di lettura e dall'ADC, rispettivamente. I segnali digitali vengono elaborati dalla unità ARM Cortex e trasmessi a un computer o a un assistente digitale personale (PDA) tramite trasmissione RF/WiFi per essere visualizzati su un'interfaccia grafica remotizzata. I dati possono essere caricati su un database via Internet, accesso remoto. I blocchi del sistema sono descritti in dettaglio di seguito.

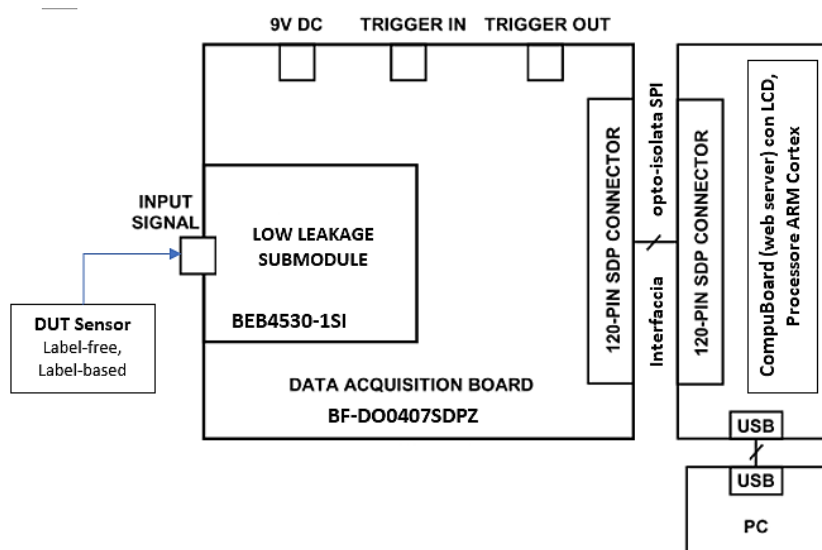


Figura 4-3: Diagramma a blocchi funzionale della configurazione del sistema prototipale BioFEVI

4.2.1 FUNZIONE E VANTAGGI DEL CIRCUITO

Il diagramma funzionale del sistema mostrato nella figura 4.4 è un front-end analogico di precisione per la misurazione della corrente fino alla gamma dei femtoampere. Questa soluzione leader del settore è ideale per i chimici e per gli strumenti di laboratorio in cui è richiesto un front-end analogico ad altissima sensibilità per il condizionamento del segnale di uscita in corrente nei sensori come fotodiodi, tubi fotomoltiplicatori e Faraday cups. Le applicazioni che possono utilizzare questa soluzione comprendono la spettrometria di massa, la cromatografia e la coulometria ecc.

Il BioFEVI DO0407SDPZ Transducer fornisce un progetto di riferimento per applicazioni nel mondo reale, suddividendo il sistema in una scheda di Low Leakage Submodule (LLS) a bassa perdita e in una scheda di acquisizione dati. Il condizionamento del segnale d'ingresso è implementato con l'EB4530-1SI sulla scheda LLS. L'EB4530-1SI è un amplificatore per elettrometri con una corrente di polarizzazione di ingresso bassissima, pari a 20 fA al massimo a 85°C. Sul chip è integrato un buffer di protezione per isolare i pin di ingresso dalle perdite sul circuito stampato (PCB). La configurazione predefinita dell'amplificatore è in modalità transimpedenza con un resistore di vetro da 10 GΩ e uno schermo metallico che impedisce alla corrente di dispersione di penetrare in uno dei percorsi ad alta impedenza della scheda. Inoltre, la scheda LLS include piazzole per resistenze e condensatori non popolate per consentire la sperimentazione prototipale con resistenze di retroazione a montaggio superficiale e altre configurazioni di ingresso.

La scheda di acquisizione dati utilizza un convertitore analogico-digitale (ADC) a 24 bit Σ - Δ ed è alimentata da una singola alimentazione a 9 Vdc. L'alimentatore di bordo genera tutte le tensioni necessarie per alimentare entrambe le schede. La scheda si collega a un PC tramite il modulo CompuBoard e utilizza l'isolamento digitale per evitare che il rumore del bus USB o i loop di massa compromettano le misure a bassa corrente.

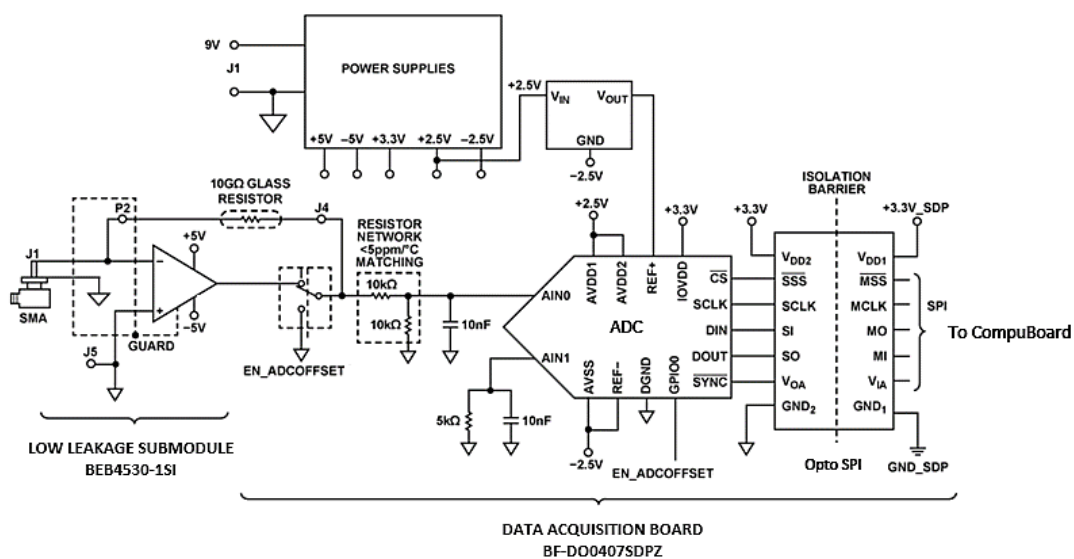


Figura 4-4: Diagramma funzionale del sistema di misura femtoampere BioFEVI DO0407SDPZ Transducer

4.2.2 DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

- *Scheda di Low Leakage Submodule a bassa dispersione:* La scheda LLS (BEB4530-1SI) è costruita su un laminato ibrido FR-4 e Rogers 4350B per ridurre al minimo le perdite di corrente. I due strati esterni sono in ceramica (Rogers 4350B), mentre lo strato interno è un laminato epossidico di vetro standard (FR-4). Il materiale Rogers 4350B offre una resistenza superiore all'isolamento in presenza di umidità rispetto al vetro o ai materiali epossidici. Inoltre, riduce al minimo le perdite di corrente e ha tempi di rilassamento dielettrico molto più brevi rispetto al vetro o ai materiali epossidici. Per ulteriori informazioni sul rilassamento dielettrico, consultare la scheda tecnica inerente.

La figura 4.5 mostra la sovrapposizione degli strati della scheda. Tutte le tracce sensibili si trovano sullo strato superiore, circondate da tracce di protezione, vias e piani.

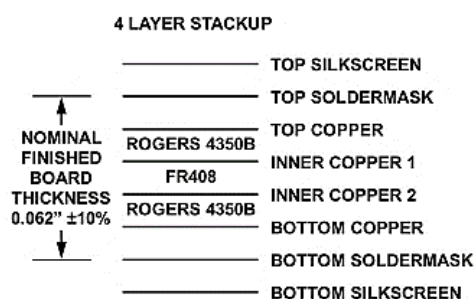


Figura 4-5: scheda LLS (BEB4530-1SI) Layer Stackup

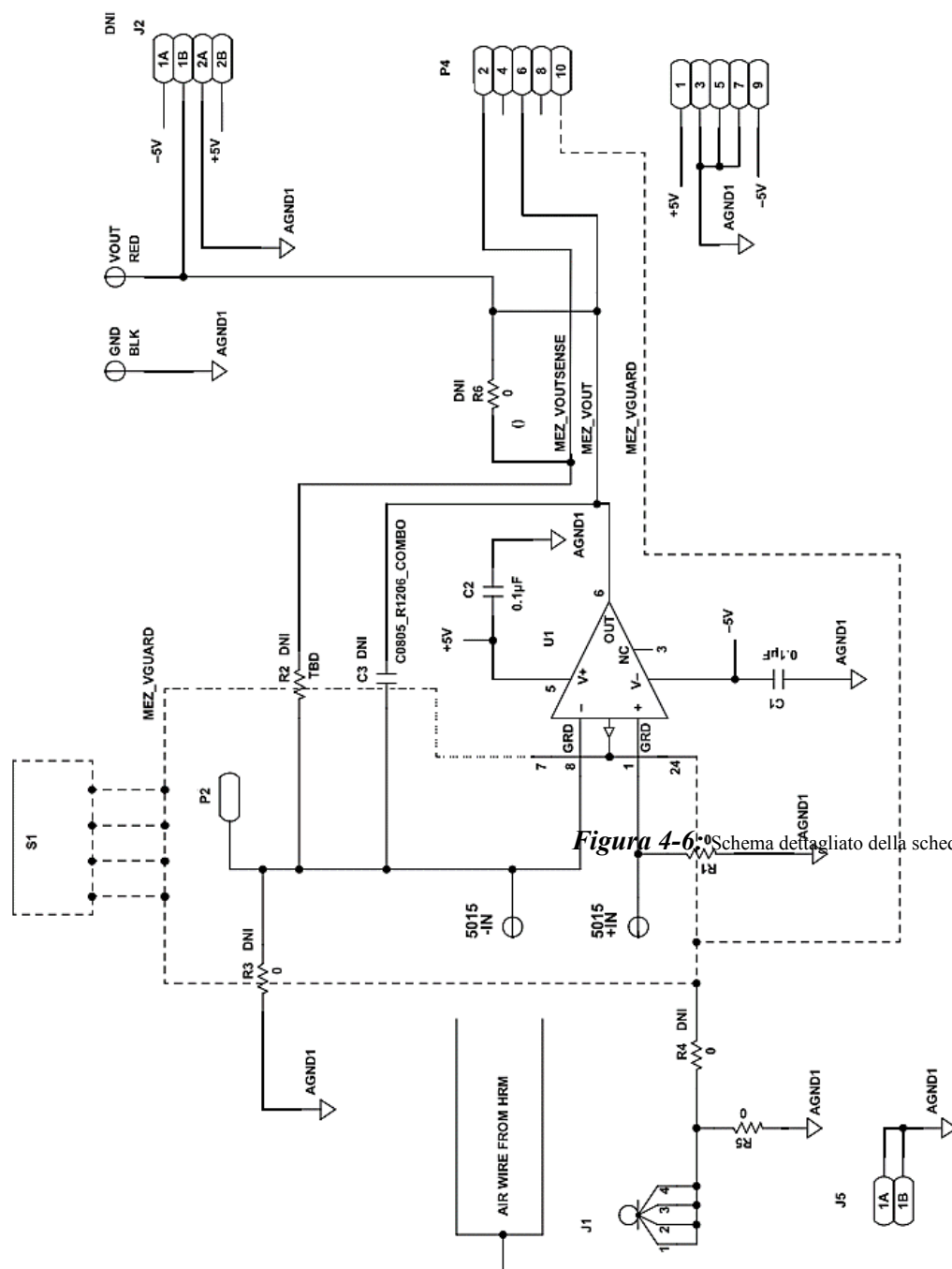
La figura 4.6 mostra lo schema dettagliato della scheda LLS (BEB4530-1SI), dove l'EB4530-1SI è configurato come amplificatore a transimpedenza (TIA) con un resistore di vetro da 10 GΩ. In questa configurazione, un filo solido è saldato dal pin centrale del connettore SMA alla piazzola -IN. Il connettore d'ingresso SMA include un cavo in politetrafluoroetilene (PTFE) tra il pin centrale e la schermatura esterna. Il connettore è montato sul fondo della scheda LLS, e il nucleo in PTFE e il pin centrale sporgono dal lato superiore. Poiché la connessione è cablata in aria attraverso il pin centrale sporgente a una piazzola sul lato superiore della scheda, tutte le tracce critiche ad alta impedenza si trovano solo sul lato superiore della scheda. La necessità di una schermatura è stata implementata sul lato inferiore della scheda e quindi eliminata. Una schermatura metallica sul lato superiore per prevenire le interferenze elettrostatiche.

Per impostazione predefinita, i componenti della scheda LLS sono configurati e pre-assemblati come indicato nella Tabella 4.1.

Tabella 4-1: Impostazione predefinita per TIA con resistore di vetro

Componente	Valore
R1	0 ohm
R2, R3, R4, R6	Open
R5	0 ohm
Resistore di Feedback	Una resistenza in vetro da 10 GΩ è posizionata sui supporti in teflon della scheda principale. Uno dei suoi conduttori (quello ad alta impedenza) è collegato alla presa a singolo pin, P2, sulla scheda LLS, e l'altro è saldato a J4 sulla scheda di acquisizione dati (si tratta di un cavo a bassa impedenza).

Con una resistenza di retroazione da 10 GΩ e un intervallo di tensione di uscita di 4,96 V, l'intervallo di corrente di ingresso corrispondente è di ±496 pA.



4.2.3 Configurazione dell'amplificatore a transimpedenza con SMT Resistore

Per le applicazioni che non necessitano della bassa perdita offerta da un resistore in vetro, R2 ha un ingombro combinato che consente di utilizzare un resistore SMT di dimensioni di 0805, 1206, 1210 o 2510. La configurazione dell'amplificatore a transimpedenza è illustrata nella Figura 4.7.

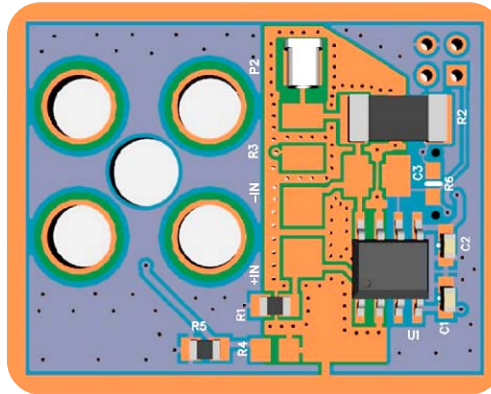


Figura 4-7: Configurazione TIA con resistenza SMT

In questa configurazione, va rimosso il cavo della resistenza di vetro da P2 sulla scheda LLS e utilizzare la resistenza desiderata su R2. Una piccola schermatura metallica si inserisce solo sulla scheda LLS. La schermatura può essere rimossa per poter valutare la scheda sia singolarmente o come parte di un sistema finale separato dalla scheda di acquisizione dati.

4.2.4 Output Sensors - Configurazione del buffer per tensione ad alta impedenza

La scheda LLS comprende anche le piazzole per configurare l'amplificatore come buffer o amplificatore non invertente per sensori con uscita ad alta impedenza. Per configurare la scheda per il condizionamento della tensione, è possibile collegare un filo pieno dal pin centrale del connettore SMA alla piazzola +IN utilizzando le impostazioni della Tabella 4.2.

Tabella 4-2: Impostazioni per la configurazione del buffer di tensione

Componente	Valore
R1, R5, R6	Open
R2, R3	Valori per il guadagno desiderato
R4	0 ohm

Con le impostazioni della Tabella 4.2, lo schermo SMA è collegato alla tensione di protezione. Utilizzare il connettore poke-home, J5 (sul lato inferiore della scheda LLS), per collegare un riferimento di massa al circuito.

Quando la scheda è configurata in modalità buffer di tensione, come mostrato nella Figura 4.8, l'uscita è limitata a circa $-4,96\text{ V}$ a $+3,5\text{ V}$ a causa dell'intervallo di tensione d'ingresso di modo comune del modulo. $+3,5\text{ V}$ a causa dell'intervallo di tensione di ingresso di modo comune dell'amplificatore. Se l'amplificatore è configurato con un guadagno ad anello chiuso maggiore di 1, l'intervallo di ingresso deve essere limitato per mantenere l'intervallo di modo comune degli ingressi dell'amplificatore.

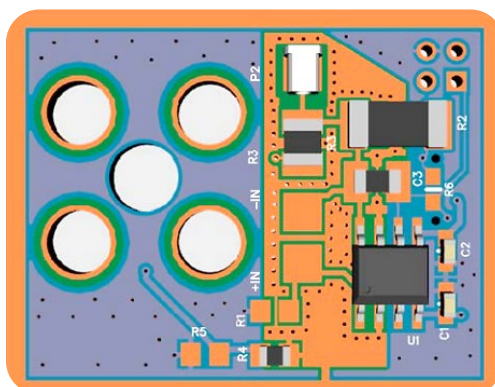


Figura 4-8: Configurazione del buffer di tensione ad alta impedenza d'ingresso

4.2.5 Scheda di acquisizione dati

La scheda di acquisizione dati (BF-DO0407SDPZ) contiene un modulo di gestione dell'alimentazione, un isolamento digitale, un ADC a 24 bit e un riferimento di tensione di precisione. Oltre ad accoppiarsi con la scheda LLS, questa scheda si accoppia anche con la scheda CompuBoard, che a sua volta si collega a un PC tramite una connessione USB e/o altre periferiche tramite WiFi e connessioni dedicate. Un layout dettagliato della scheda di acquisizione dati è disponibile nel pacchetto di supporto alla progettazione che verrà presentato nella fase 4 del presente progetto di ricerca.

4.2.6 Gestione dell'alimentazione

La figura 4.9 mostra un diagramma semplificato della sezione di gestione dell'energia che si trova sulla scheda di acquisizione dati. Un alimentatore esterno da 9 Vdc , collegato al connettore J1, alimenta la scheda LLS, l'amplificatore e la sezione di isolamento digitale. Il circuito di ingresso include una protezione contro transitori di sovratensione e contro la

tensione inversa. Tre LDO generano 5 V per l'amplificatore della scheda LLS, 2,5 V per il front-end analogico-digitale $\Sigma\Delta$ (ADC), e 3,3 V per l'ingresso/uscita digitale e gli isolatori. La scheda CompuBoard fornisce l'alimentazione per la sezione Opto-isolata della scheda.

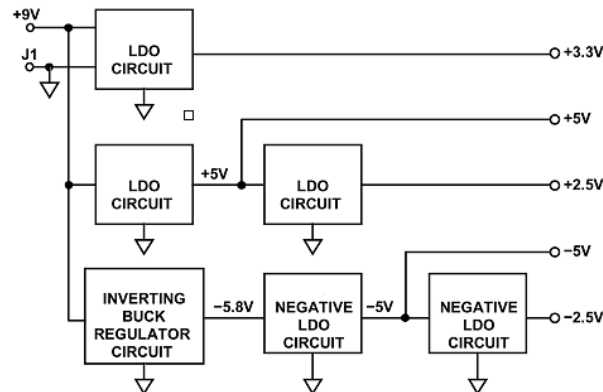


Figura 4-9: Schema a blocchi semplificato dell'alimentazione

Un LED a bordo indica che l'alimentazione è attiva e che il sistema funziona correttamente. Poiché alcune applicazioni possono utilizzare sensori di luce sensibili, il software di include un'opzione per spegnere il DS1 mentre la scheda sta acquisendo i dati.

Il regolatore buck invertente costruito attorno al regolatore DC-DC con clock esterno di Sincronizzazione, 36 V, 1 A, step-down, prende l'ingresso dc e genera circa -5,8 V. Il regolatore a commutazione funziona in modalità a frequenza fissa (PWM forzato), che si traduce in un'efficienza inferiore (rispetto alla modalità di skipping dell'impulso), ma mantiene una frequenza di commutazione costante vicino a 1 MHz, il che lo rende facile da filtrare. Poiché l'intero sistema consuma meno di 5 mA dagli alimentatori negativi, la bassa efficienza dell'alimentazione negativa, non è un problema.

L'uscita del regolatore buck invertente alimenta due regolatori lineari negativi per fornire -2,5 V al $\Sigma\Delta$ (ADC) e -5 V LLS.

Uno schema dettagliato e il layout della scheda di acquisizione dati compresi i circuiti di gestione dell'alimentazione, sono disponibili nel pacchetto di supporto alla progettazione che verrà presentato nella fase 4 del presente progetto di ricerca.

4.2.7 $\Sigma\Delta$ (ADC) e riferimenti

L'uscita della scheda LLS ha un intervallo di tensione di uscita fino a ± 5 V, mentre il $\Sigma\Delta$ ADC ha un intervallo di ingresso di ± 2.5 V. Un divisore di resistenza abbinato da 10 k Ω /10 k Ω attenua l'uscita della scheda LLS di un fattore di pari a due. Per ridurre al minimo errori di offset dovuti all'ADC, un interruttore ADG a singolo polo/doppio passo (SPDT)

cortocircuita l'ingresso del divisore di resistenza a massa e consente al software di misurare l'errore di offset dovuto all'ADC e al divisore di resistenza. Quando la cancellazione dell'offset è abilitata, il software sottrae l'errore di offset misurato da ogni lettura. L'eventuale offset rimanente è dovuto solo alla circuiteria della scheda LLS.

La linea digitale GPIO0 (EN_ADCOFFSET) del $\Sigma\Delta$ (ADC) controlla la posizione dell'interruttore ADG. Il software scrive sul registro GP_DATA0, ottenendo un'uscita 0 o 1 su GPIO0. L'uscita è riferita a -2,5 V; pertanto, il pin di massa dell'ADG è collegato a -2,5 V anziché a terra.

Il regolatore di tensione (ADR) a valle del Power Supplies fornisce un riferimento a basso rumore ed elevata precisione all'ADC. Il front-end dell'ADC è alimentato da $\pm 2,5$ V; pertanto, il pin GND dell'ADR è anch'esso legato all'alimentazione a -2,5 V. Questo collegamento sviluppa la tensione di riferimento a 2,5 V tra i pin REF+ e REF- dell'ADC.

4.2.8 *Trigger In and Trigger Out*

La scheda BioFEVI DO0407SDPZ Transducer include controlli di trigger in e trigger out per semplificare l'interfacciamento della scheda a dispositivi esterni. per semplificare l'interfacciamento della scheda con apparecchiature esterne. Entrambi i segnali di trigger in e di trigger out utilizzano livelli TTL standard.

Quando il trigger in è abilitato tramite software, il sistema attende un fronte di salita sul trigger in prima di iniziare ad acquisire i dati. Allo stesso modo, quando il trigger out è abilitato, il sistema emette un fronte di salita all'inizio dell'acquisizione dei dati.

4.2.9 *Pulizia e manipolazione della scheda LLS*

È importante maneggiare sempre le schede LLS per i bordi e non toccare mai l'area all'interno dello schermo SHIELD1. In caso di rilavorazione dei componenti sulla scheda LLS, la scheda deve essere pulita adeguatamente per rimuovere eventuali contaminanti, come il flusso di saldatura, l'umidità salina, la sporcizia e la polvere per mantenere le prestazioni a bassa perdita. Eventuali contaminanti possono degradare le femtoampere performance.

Una procedura di pulizia efficace consiste nelle seguenti fasi:

1. Immergere la scheda in un bagno a ultrasuoni con alcool isopropilico per camere bianche per 15 minuti. Questo tipo di pulizia utilizza ultrasuoni ad alta frequenza, creando una cavitazione nella soluzione detergente. Questo processo aiuta a rimuovere contaminanti sulla superficie della scheda e nelle zone sotto i componenti saldati che sono difficili da raggiungere. Le successive fasi di pulizia richiedono l'uso di alcol isopropilico fresco.
2. Rimuovere la scheda dal bagno a ultrasuoni con un paio di pinze.

Risciacquare e sciacquare la scheda con alcool isopropilico per rimuovere i residui di contaminanti.

3. Inondare la scheda con alcool isopropilico e strofinarla delicatamente con una spazzola acida. Concentrarsi sulle aree tra i pin U1, J1, gli anelli di protezione e l'area all'interno del profilo di schermatura.

4. Sciacquare e lavare la scheda con alcol isopropilico.

5. Risciacquare la scheda con alcool isopropilico per la parte superiore e inferiore.

6. Usare aria compressa e secca per asciugare il pcb. Soffiare l'aria intorno ai pin di U1, le tracce di ingresso a J1 e l'area dell'anello di protezione. Assicurarsi di dirigere l'aria compressa anche sotto J1 e U1.

7. Per assicurarsi che la scheda sia completamente asciutta, metterla in stufa a 125°C per 15 minuti.

8. Dopo la pulizia, ricordarsi di posizionare la schermatura metallica sulla scheda che aiuta a prevenire qualsiasi contatto con l'area protetta.

4.2.10 VERIFICA E TEST DEI CIRCUITI

Questo circuito utilizza la scheda BioFEVI DO0407SDPZ Transducer e la piattaforma dimostrativa del sistema CompuBoard. Il software per il test comunica con la scheda CompuBoard per acquisire i dati dalla scheda BioFEVI DO0407SDPZ Transducer.

4.2.11 Attrezzatura necessaria

Sono necessarie le seguenti apparecchiature:

- PC con porta USB e Windows® XP, Windows Vista (32 bit),
- Scheda di Test BioFEVI DO0407SDPZ Transducer, che include la scheda LLS a bassa perdita (BEB4530-1SI) e la scheda di acquisizione dati (BF-DO0407SDPZ),
- scheda CompuBoard,
- Alimentatore 9 Vdc o presa a muro,
- Software per il Test BFS-DO0407,

Inoltre, si consiglia di utilizzare un cavo coassiale di alta qualità per collegare il segnale proveniente dal DUT alla scheda di misurazione.

4.2.12 Diagramma a blocchi funzionale del dispositivo ed esecuzione del software di test

Per quanto concerne l'esecuzione del Test 1 del dispositivo BioFEVI, di seguito si riporta il diagramma funzionale delle parti necessarie il Setup.

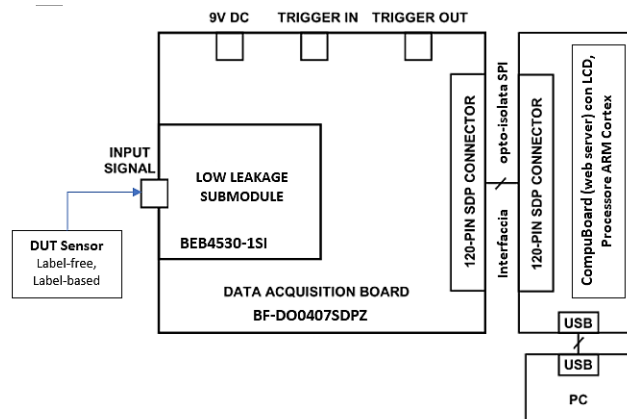


Figura 4-10: Diagramma a blocchi funzionale Test 1 del sistema prototipale BioFEVI

Il software di valutazione dispone di una scheda dati campionati in cui vengono visualizzati i dati nel dominio del tempo e della frequenza, e una schermata di configurazione che consente di impostare i parametri quali il trigger, la correzione dell'offset, la configurazione della scheda e la calibrazione manuale.

- *Scheda di configurazione:* La figura 4.11 mostra la schermata di configurazione. La sezione Triggering include una rappresentazione grafica della funzionalità di attivazione. Selezionare le caselle di controllo desiderate per attivare il trigger in o il trigger out, e inserire il ritardo desiderato tra il segnale di trigger in, il segnale di trigger out e il momento in cui l'ADC inizia l'acquisizione. Selezionare la casella cancellazione offset per misurare e rimuovere l'errore di offset dovuto all'ingresso dell'ADC e alla corrente di polarizzazione di ingresso.

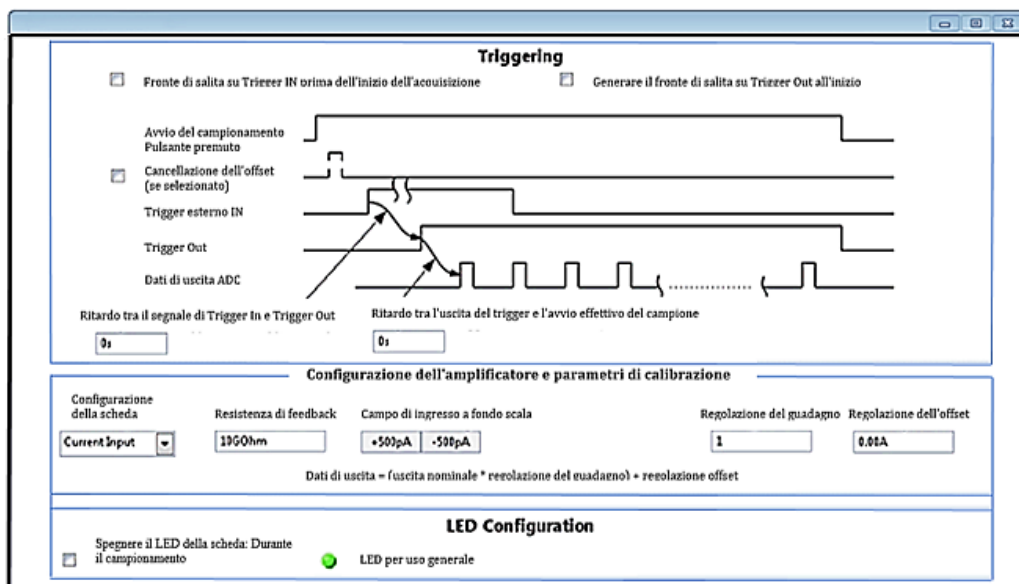


Figura 4-11: Piattaforma di misura Femtoampere (Software BFS-DO0407)

Impostare la configurazione della scheda (nel paragrafo Configurazione dell'amplificatore e parametri di calibrazione) in modo che corrisponda alla configurazione della scheda LLS. Poiché l'amplificatore è configurato in modalità transimpedenza, l'impostazione predefinita è Ingresso corrente. In questa modalità, il controllo del resistore di retroazione è visibile per permettere di modificarlo con valori diversi dalla configurazione base.

Di default si è impostato su 10 GΩ. Il valore dell'intervallo di ingresso a fondo scala rappresenta il fondo scala del sistema, riferito all'ingresso, e viene calcolato in base al valore del resistore di retroazione o al guadagno specificato se configurato come buffer di tensione. Oltre alla compensazione dell'offset, l'utente può anche applicare la calibrazione manuale del sistema, fornendo un valore di guadagno e di offset. Di base la regolazione dell'offset è impostata su 0 e la regolazione del guadagno è impostata su 1. I dati presentati nel software di Test corrispondono alla seguente equazione:

Misura di uscita = (lettura grezza + regolazione offset) × Regolazione del guadagno

La sezione Configurazione dei LED controlla i LED della scheda. Facendo clic su Uso Generale LED attiva il LED corrispondente, e si spegne. Fare clic su Uso Generale LED è un modo veloce per verificare che il sistema comunichi con il software di Test. Inoltre, Spegner i LED della scheda durante il campionamento dei dati. Quando si utilizza un fotodiodo o altri sensori di luce, lo spegnimento dei LED sulla scheda può migliorare le misure.

- *Dati campionati dalla scheda:* Dal menu a tendina si seleziona la frequenza di campionamento e la velocità dei dati di uscita dell'ADC tra 0,82 SPS e 867,2 SPS.

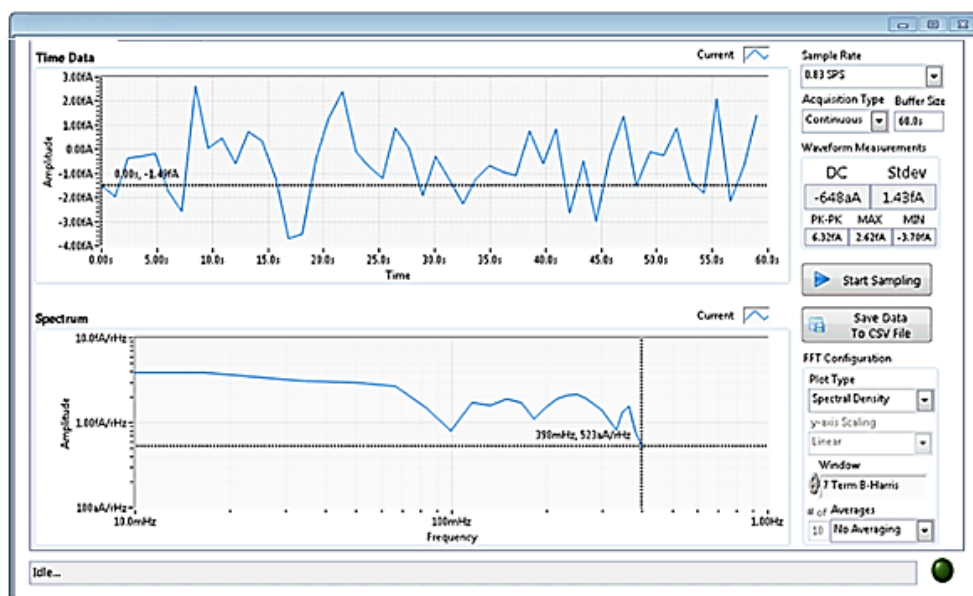


Figura 4-12: Campionamento dati dal sistema BioFEVI

Dopo aver selezionato la frequenza di campionamento desiderata, si può selezionare la dimensione del buffer di acquisizione in secondi. Questa selezione determina la quantità di dati visualizzati sullo schermo e conservati in memoria. Si potrà fare clic su Avvia campionamento per iniziare l'acquisizione dei dati dalla scheda. Per le velocità di uscita dei dati si opta per valori di 19,99 SPS e inferiori, il display viene aggiornato in modo continuo come una finestra mobile. Per le velocità di uscita dei dati superiori a 19,99 SPS, la frequenza di aggiornamento del grafico è pari alla durata di acquisizione e aggiornamento del grafico. La barra di stato nella parte inferiore dello schermo mostra il tempo che manca al prossimo aggiornamento. In caso di acquisizione continua, il sistema acquisisce i dati finché l'utente non fa clic su Interrompi campionamento. Nelle acquisizioni singole, il sistema si ferma dopo aver raggiunto la dimensione del buffer specificata. Sopra il pulsante di avvio del campionamento, gli indicatori visualizzano le informazioni sul dominio del tempo, come il valore dc del segnale di input e la deviazione standard. Quando si misura un ingresso in corrente continua, la deviazione standard è pari al rumore efficace del segnale. La sezione inferiore della scheda Dati campionati visualizza i dati nel dominio della frequenza del sistema. I controlli sulla destra configurano il grafico del dominio della frequenza come spettro di potenza o densità spettrale di potenza. L'utente può anche configurare il tipo di finestra, attivare la media e configurare il numero di medie da eseguire. Quando si visualizza il grafico dello spettro di potenza, usare il controllo di scala dell'asse Y per impostare le unità dell'asse Y su dB del fondo scala o unità lineari (volt o ampere, a seconda della configurazione della scheda).

Fare clic su Salva dati su file CSV per salvare i grafici del dominio del tempo e della frequenza in due file separati da virgole.

- *Procedura test del sistema:* Collegare l'alimentazione esterna e lanciare il software per il test. Il software è in grado di comunicare con il sistema BioFEVI DO0407SDPZ Transducer se il driver della piattaforma di sviluppo BioFEVI appare tra le periferiche del sistema operativo impiegato. Quando le comunicazioni USB sono stabilite, la scheda CompuBoard può inviare,

ricevere e acquisire dati seriali dal BioFEVI DO0407SDPZ Transducer. Per misurare il rumore del sistema, assicurarsi che la schermatura sia installata sulla scheda e non sia collegato nulla al connettore SMA d'ingresso. Per ottenere prestazioni ottimali, collocare l'intero gruppo all'interno di una scatola metallica, collegata elettricamente a terra. Nella schermata di configurazione del software sopra citato, selezionare la casella Cancellazione offset, e assicurarsi che il sistema sia configurato come Ingresso corrente con una resistenza da 10 GΩ.

Nella scheda Dati campionati, selezionare la frequenza di campionamento desiderata dalla casella frequenza di campionamento desiderata e fare clic su Avvia campionamento. Il rumore termico del resistore da 10 G Ω può dominare il rumore del sistema; pertanto, per ottenere le migliori prestazioni, selezionare la frequenza di campionamento al più basso valore

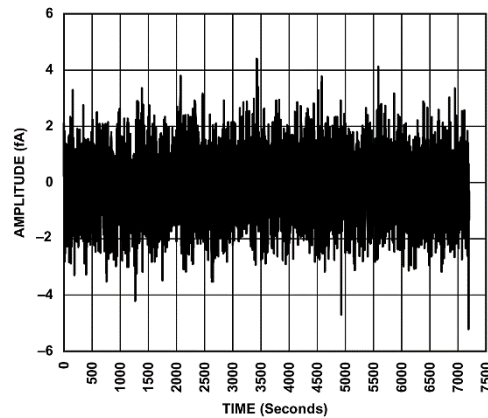


Figura 4-13: Campionamento dati con Open Input a 0,82 SPS

disponibile. Ad esempio, la figura 4.13 mostra il rumore del sistema quando si campiona a 0,83 SPS per 120 minuti. Il rumore rms risultante è di 1,4 fA con un valore dc di -150 aA.

La figura 4.14 mostra la fotografia del sistema BioFEVI DO0407SDPZ Transducer, compresa la scheda LLS a bassa perdita, la scheda di acquisizione dati (BF-DO0407SDPZ) e l'array di petri.

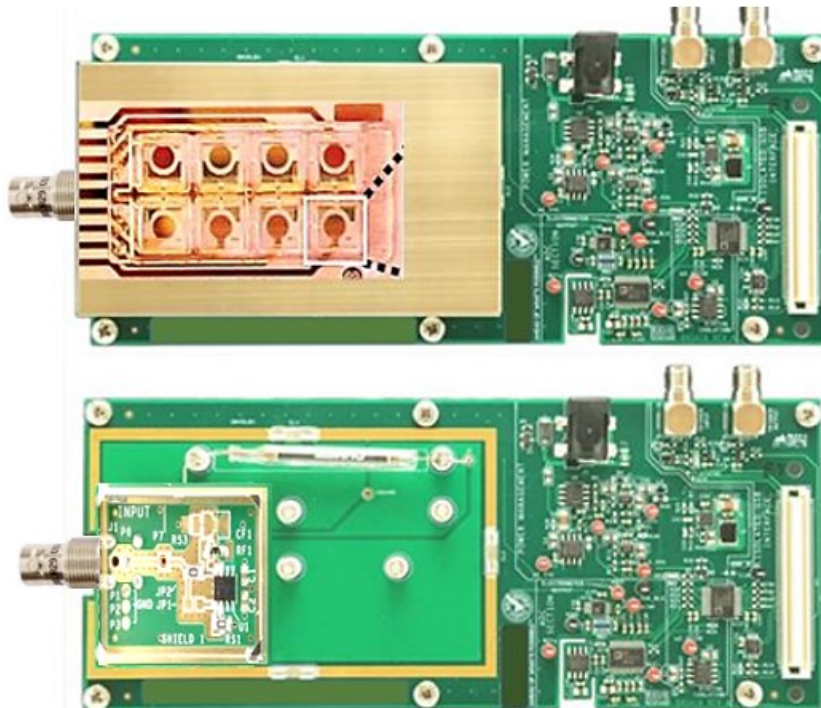


Figura 4-14: Sistema BioFEVI DO0407SDPZ Transducer con shield e Array di petri

4.3 Tecniche di misura con il modulo LLS

La LLS a bassa perdita (BEB4530-1SI) è stata prototipata in due configurazioni predefinite: BEB4530-1SI-BUF, che rappresenta il dispositivo sotto test (DUT) in modalità buffer, e la BEB4530-1SI-TIA, che rappresenta il DUT in modalità transimpedenza.

Le schermature metalliche presenti su BEB4530-1SI impediscono l'accoppiamento capacitivo da interferenze esterne. Le schermature impediscono inoltre contatto con l'area protetta e quindi impediscono la contaminazione da impronte digitali o polvere sugli ingressi ad alta impedenza. I modelli BEB4530-1SI-BUF e BEB4530-1SI-TIA sono dotati di due schermi di 1,0 pollici $\times$ 1,5 pollici $\times$ 1,5 pollici pre-assemblati sulla parte superiore (SHIELD1) e inferiore (SHIELD3) della scheda. Inoltre, una schermatura metallica più grande (SHIELD2) da 1,5 pollici $\times$ 3 pollici $\times$ 0,75 pollici è stata realizzata separatamente con ogni scheda di Test. Le clip metalliche sono montate su ogni scheda per tenere SHIELD2 in posizione. Il buffer di protezione porta queste schermature al potenziale del pin non invertente del DUT. Per ottenere una schermatura elettrostatica ancora più robusta, è necessario schermare la BEB4530-1SI con una scatola metallica, quando si valuta la corrente di polarizzazione d'ingresso. Questa struttura a scatola chiusa è efficace perché la schermatura esterna è collegata a terra e la schermatura interna è guidata al potenziale di terra dalla protezione esterna.

La BEB4530-1SI è inoltre pre-assemblata con una resistenza di uscita da 499 Ω , che isola qualsiasi carico di uscita dall'output dell'amplificatore e previene le oscillazioni dovute a un carico capacitivo eccessivo. In questa specifica, I_{B+} si riferisce alla corrente di polarizzazione in ingresso che scorre attraverso il pin non invertente del DUT e I_{B-} si riferisce alla corrente di polarizzazione di ingresso che scorre attraverso il pin invertente del DUT. I_B si riferisce sia a I_{B+} che a I_{B-} . I tre paragrafi successivi descrivono i diversi metodi di misurazione della corrente di polarizzazione d'ingresso che possono essere implementati sul BEB4530-1SI.

4.3.1 Misurazioni con il Keithley 2635B

La corrente di polarizzazione d'ingresso tipica dell'BEB4530-1 a 25°C è di <1 fA, e questa corrente bassissima è impossibile da misurare con precisione con qualsiasi misuratore disponibile. Ad esempio, la corrente di offset di un SourceMeter Keithley 2635B con un intervallo di 1 pA è già limitata a 7 fA. Pertanto, per misurare I_B , è necessario riscaldare il DUT per aumentare la corrente di bias di ingresso a un valore misurabile. A 125°C, I_B è misurabile con un massimo di ± 250 fA, secondo le specifiche della scheda tecnica. Ai fini del test I_{B+} , il BEB4530-1SI-BUF viene collocato in una camera termica. Per misurare I_{B+} , collegare il BEB4530-1 (tramite J1) direttamente al SourceMeter Keithley 2635B con un cavo

triax. Si veda la figura 4.15 per uno schema semplificato e la Figura 4.16 per il SourceMeter utilizzato.

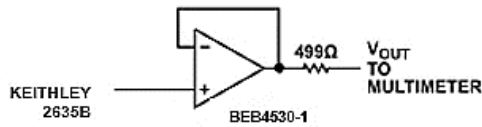


Figura 4-15: Schema semplificato per la misura di I_{B+} con il Keithley 2635b



Figura 4-16: Keithley 2635B SourceMeter

Seguono le procedure per l'impostazione del test di misurazione:

1. Utilizzare il dispositivo BEB4530-1SI-**BUF** Assicurarsi che SHIELD1 e SHIELD3 siano chiusi,
2. Posizionare BEB4530-1SI-**BUF** in una scatola metallica come mostrato in figura 4.17,
3. Coprire la scatola metallica e collocare il BEB4530-1SI-**BUF** in una camera di simulazione,
4. Collegare il connettore triax di ingresso (J1) alla porta IN/OUT del preamplificatore remoto Keithley 2635B tramite un cavo triax in grado di resistere fino a 125°C, Molti cavi triax funzionano solo fino a 85°C. Un cavo triax da 125°C può essere costruito utilizzando i cavi Harbour Industries M17/131-RG403 TRX e un connettore triax modello 5218 di Pomona Electronics.
5. Impostare la camera di simulazione a 125°C. Non posizionare il Keithley 2635B Remote PreAmp o SourceMeter nella camera di simulazione,
6. Dopo che la camera di simulazione ha raggiunto i 125°C, lasciare all'interno la scheda di Test per un'ora.

Le procedure di test per la misura di I_{B+} inerente il BEB4530-1 utilizzando il SourceMeter Keithley 2635B:

1. Fornire l'alimentazione alla scheda BEB4530-1SI-BUF:
 - a. V_+ (J3): 5 V
 - b. GND (J4): 0 V
 - c. V_- (J5): -5 V
2. Fornire l'impostazione del test per il SourceMeter Keithley 2635B:
 - a. Gamma automatica: off
 - b. Tensione della sorgente (V): 0 V
 - c. Corrente di misura (I): impostare l'intervallo di corrente su 1 pA
 - d. Numero di cicli della linea di alimentazione (NPLC): 1 (velocità normale)
 - e. Filtro: automatico
3. Registrare i dati di misura per 300 secondi a 1 campione al secondo (SPS) e calcolare la media I_{B+} . Si noti che periodi di misura più lunghi producono una media più accurata. La media I_{B+} deve essere inferiore a 100 fA.



Figura 4-17: Scatola metallica (collegata alla messa a terra) che racchiude l'unità di misura BEB4530-1SI-BUF

La Figura 4.18 mostra i dati raccolti dalla misurazione di un tipico DUT per 5000 secondi. La media di I_{B+} misurata è circa 11 fA a 12 fA a 125°C. La corrente di polarizzazione di ingresso tipica a 125°C varia da dispositivo a dispositivo. La maggior parte dei DUT si misureranno con meno di 100 fA con la BEB4530-1SI-BUF.

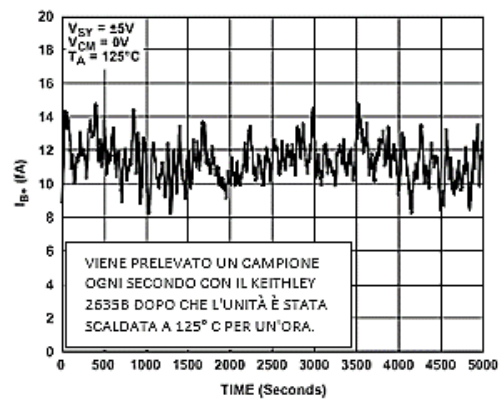


Figura 4-18: Corrente di Bias dell'ingresso non invertente (I_{B+}) vs. tempo

4.3.2 Misura dell'integrazione capacitiva

La corrente che attraversa un condensatore (I_C) può essere calcolata utilizzando il valore della capacità (C) e la variazione misurata della tensione di uscita attraverso il condensatore nel tempo (dV_C/dt) con l'equazione equazione:

$$I_C = C \frac{dV_C}{dt} \quad (47)$$

Questa relazione può essere utilizzata per calcolare I_{B+} in base alla velocità con cui si carica la capacità di ingresso del DUT ed osservare la carica della capacità di ingresso misurando l'uscita del DUT in configurazione buffer con l'ingresso non invertente non collegato.

Per calcolare I_{B+} , utilizzare la seguente equazione:

$$I_{B+} = \frac{C_P dV_{out}}{dt} \quad (48)$$

dove:

C_P è la capacità di ingresso.

dV_{OUT}/dt è la variazione della tensione di uscita dell'amplificatore nel tempo.

La figura 4.19 mostra uno schema semplificato del metodo di integrazione capacitiva.

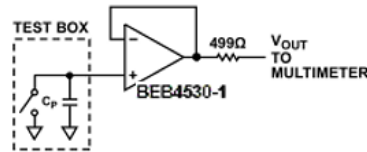


Figura 4-19: Schema semplificato del metodo di integrazione capacitiva

Come per il metodo di misurazione descritto nella sezione Keithley 2635B di Misurazione, posizionare il BEB4530-1SI-BUF in una camera di simulazione. Accedere all'ingresso non invertente del DUT utilizzando un cavo/connettore triax collegato a una cassetta di test all'esterno della camera di simulazione, figura 4.20. La box di test è costituita da un connettore triax con accesso all'ingresso non invertente del segnale, alla protezione e al potenziale di massa del segnale, figura 4.21.



Figura 4-20 a, b: Metodo di misura dell'integrazione capacitiva - scatola di prova e connettore triax

Per calcolare la corrente di polarizzazione d'ingresso a partire dalla tensione di uscita del DUT, è necessario conoscere il valore della capacità di ingresso. Pertanto, la capacità totale di ingresso (C_P), che consiste nella capacità del DUT, della scheda, delle tracce e del cavo triax, deve essere misurata. Due metodi consigliati per il controllo incrociato del valore di C_P sono l'uso di una resistenza in serie di ingresso e l'uso di un condensatore di test in ingresso.

4.3.3 Misura della capacità totale d'ingresso con un resistore di ingresso in serie

Questo metodo calcola la capacità totale di ingresso misurando la frequenza del polo creato dall'interazione tra una resistenza nota e la capacità di ingresso.

Le linee guida per la misurazione sono le seguenti:

1. Utilizzare il modello BEB4530-1SI-BUF. Cortocircuitare la protezione triax con la protezione dell'amplificatore sul BEB4530-1SI-BUF utilizzando JP3.
2. Posizionare il BEB4530-1SI-BUF in una scatola metallica e Collegare il BEB4530-1SI-BUF alla scatola di prova con un cavo/ connettore triax come in figura 4.20a.
3. Collegare un generatore di funzioni al pin d'ingresso della scatola di test attraverso una resistenza in serie R_S e un oscilloscopio all'uscita al BEB4530-1SI-BUF come in figura 4.21.
4. Mettere in cortocircuito la resistenza in serie di ingresso, R_S .
5. Con il generatore di funzioni, applicare un'onda sinusoidale in ingresso di 1kHz, 1Vp/p.
6. Verificare con l'oscilloscopio che $V_{OUT} = V_{IN}$.
7. Rimuovere il cortocircuito su R_S . Per R_S si utilizza un resistore da 8 M Ω . Per ridurre la capacità parassita, utilizzare più resistenze in serie invece di una sola. In questo caso, quattro resistenze da 2 M Ω sono saldati in serie.
8. Aumentare lentamente la frequenza del segnale di ingresso fino a quando l'uscita scenda di un fattore $\sqrt{2}$. A questa frequenza, la frequenza del segnale di ingresso al punto di -3dB è

$$f_{-3dB} = \frac{1}{2\pi \times R_S \times C_P} \quad (49)$$

Quindi,

$$C_P = \frac{1}{2\pi \times R_S \times f_{-3dB}} \quad (50)$$

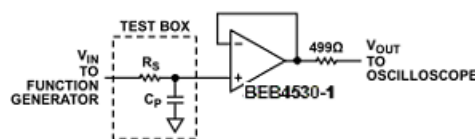


Figura 4-21: Misura della capacità totale d'ingresso con un resistore in serie di ingresso

4.3.4 Misura della capacità totale d'ingresso con un condensatore d'ingresso di Test

Questo metodo calcola la capacità totale di ingresso misurando l'attenuazione di una tensione di ingresso utilizzando un partitore di tensione creato dalla capacità di ingresso e da una capacità nota.

Le linee guida per la misurazione sono le seguenti:

1. Utilizzare il modello BEB4530-1SI-BUF. Cortocircuitare la protezione triax con la protezione dell'amplificatore sul BEB4530-1SI-BUF utilizzando JP3.
2. Posizionare la BEB4530-1SI-BUF in una scatola metallica e Collegare il BEB4530-1SI-BUF alla scatola di Test con un cavo/connettore triax come in figura 4.20a.
3. Collocare un condensatore di valore noto, C_{TEST} , sul pin di ingresso a 10 pF. Collegare un generatore di funzioni al pin di ingresso della scatola di test attraverso C_{TEST} e un oscilloscopio all'uscita del BEB4530-1SI-BUF come in figura 4.22.
4. Con un generatore di funzioni, applicare un'onda sinusoidale in ingresso di 1kHz, 1Vp/p.
5. Con l'oscilloscopio, misurare la tensione di uscita dal picco a picco.
6. La **funzione di trasferimento** ingresso/uscita è la seguente:

$$\frac{V_{OUT}}{V_{IN}} = \frac{C_{TEST}}{C_P + C_{TEST}} \quad (51)$$

Quindi,

$$C_P = \frac{C_{TEST}(V_{IN} - V_{OUT})}{V_{OUT}} \quad (50)$$

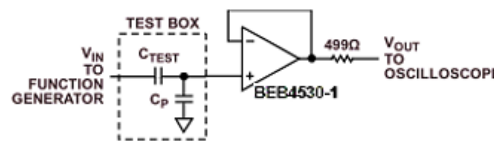


Figura 4-22: Misura della capacità totale d'ingresso con un condensatore di test

4.3.5 Misura di I_{B+} con capacità di ingresso nota

In media, i due metodi di misurazione della capacità di ingresso producono una capacità parassita di ingresso misurata di circa 2 pF per il dispositivo BEB4530-1SI-BUF. Si noti che questo valore di capacità è inferiore alle specifiche dell'amplificatore, considerando la lunghezza del cavo triax utilizzato. Il buffer di protezione interno, riduce notevolmente il valore effettivo della capacità d'ingresso.

Con la capacità d'ingresso nota, è possibile misurare la velocità di rampa della tensione di uscita dal DUT che può essere misurata per calcolare I_{B+} .

La figura 4.19 illustra lo schema semplificato di questo metodo di integrazione capacitiva.

Seguono le procedure per l'impostazione della misura di prova:

1. Utilizzare BEB4530-1SI-**BUF**. Assicurarsi che SHIELD1 e SHIELD3 siano chiusi.
2. Cortocircuitare la protezione triax con la protezione dell'amplificatore sul BEB4530-1SI-**BUF** utilizzando JP3.
3. Posizionare il BEB4530-1SI-**BUF** in una scatola metallica come in figura 4.20a.
4. Collocare la scatola metallica contenente il BEB4530-1SI-**BUF** nella camera di simulazione.
5. Collegare il connettore triax di ingresso (J1) alla scatola di prova come in figura 4.19 e utilizzare un cavo triax in grado di resistere fino a 125°C. Molti cavi triax sono funzionali solo fino a 85°C. Un Cavo Triax Da 125°C può essere costruito utilizzando il cavo Harbour Industries M17/131-RG403 e il connettore triax modello 5218 di Pomona Electronics.
6. Collegare l'uscita della scheda a un multimetro tramite il connettore BNC di uscita o la morsettiera di uscita. In laboratorio, un multimetro da 5,5 a 6,5 cifre che supporti la registrazione dei dati.
7. Impostare la camera di simulazione a 125°C.
8. Dopo che la camera di simulazione ha raggiunto i 125°C, lasciare all'interno per un'ora il dispositivo BEB4530-1SI-**BUF**.

Le procedure di test per la misurazione di I_{B+} di BEB4530-1 con il metodo di misurazione dell'integrazione capacitiva è la seguente:

1. Fornire le seguenti alimentazioni al BEB4530-1SI-**BUF**:
 - a. V_+ (J3): 5 V
 - b. GND (J4): 0 V
 - c. V_- (J5): -5 V
2. Fornire l'impostazione del test per il Keithley 2635B:
 - a. Gamma automatica: off
 - b. Intervallo personalizzato: 10 V
 - c. Ritardo: 1 msec
 - d. Ritardo di misurazione: 1 secondo
 - e. NPLC: 1 (velocità normale)
3. Utilizzando la scatola di Test, cortocircuitare l'ingresso non invertente del DUT a massa del segnale per circa 10 secondi.

4. Rimuovere il cortocircuito verso massa e lasciare il pin non invertente non collegato.
5. La corrente capacitiva (I_{CAP}) che fluisce attraverso la capacità di ingresso apparirà come una variazione della tensione di uscita del DUT.
6. Registrare la tensione di uscita con il multimetro per 300 secondi a 1 SPS.

La figura 4.23 e la figura 4.24 mostrano rispettivamente la tensione di uscita della scheda in funzione del tempo e la corrente capacitiva in funzione del tempo e la corrente capacitiva rispetto al tempo, rispettivamente.

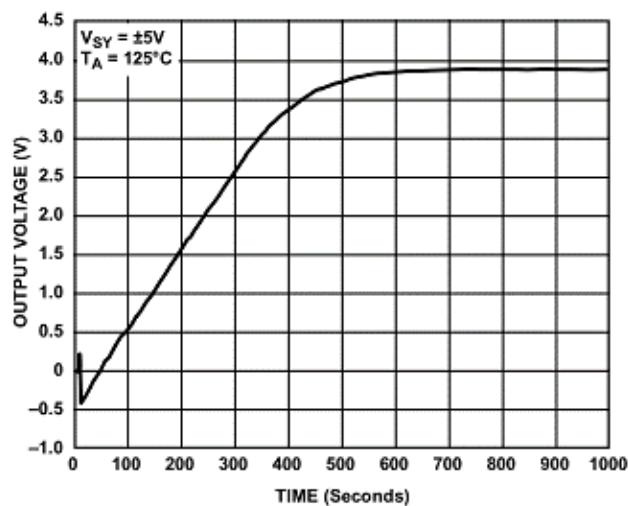


Figura 4-23: Tensione di uscita rispetto al tempo

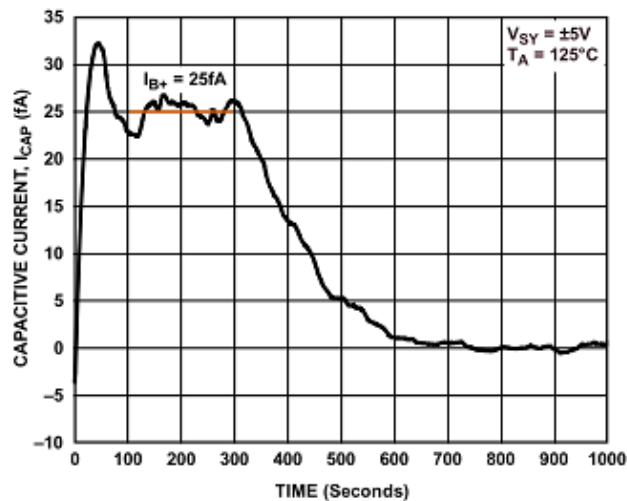


Figura 4-24: Corrente capacitiva vs. tempo

Da 0 secondi a 10 secondi, l'ingresso non invertente è cortocircuitato a massa. La tensione di uscita misura quindi quasi a 0 V per i primi 10 secondi. Quando l'ingresso non invertente viene scollegato da terra, la tensione di uscita cambia bruscamente.

Trattandosi di uno scollegamento manuale, eventuali vibrazioni o cariche delle dita possono essere accoppiate all'ingresso e causare picchi di tensione di uscita, come si vede al tempo = 10 secondi. I relè non vengono utilizzati per cortocircuitare e aprire il pin di ingresso a causa della loro bassa resistenza di isolamento. Un relè con una bassa resistenza di isolamento diminuisce la resistenza totale vista all'ingresso non invertente, compromettendo l'accuratezza della misura.

Subito dopo che l'ingresso non invertente viene lasciato scollegato, la corrente di polarizzazione d'ingresso (I_{B+}) attraversa la capacità parassita d'ingresso, causando una variazione della tensione d'uscita. Misurare la corrente capacitiva subito dopo che il pin non invertente è stato scollegato da terra (vedi figura 4.24) perché in questo breve periodo di tempo, la corrente capacitiva (I_{CAP}) ha un valore molto più vicino a I_{B+} . Quando la tensione di ingresso non invertente aumenta, la corrente di perdita attraverso la resistenza parassita (I_{RES}) sulla scheda diventa significativa. Pertanto, la variazione della tensione di uscita è funzione sia di I_{RES} che di I_{CAP} come mostrato in figura 4.25.

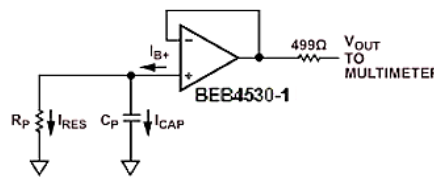


Figura 4-25: Capacitanza parassita di ingresso della scheda utilizzata per misurare la corrente di bias di ingresso

Inoltre, la corrente di polarizzazione in ingresso non è costante nell'intervallo di tensione di modo comune di ingresso (si vedano i grafici della corrente di polarizzazione di ingresso rispetto alla tensione di modo comune di ingresso del BEB4530-1). Questo cambiamento può spiegare la variazione della pendenza di integrazione come in figura 4.24. La tensione di uscita interrompe la rampa (come in figura 4.23) quando la corrente di polarizzazione di ingresso è uguale alla tensione di modo comune di ingresso divisa per R_P . Questa condizione tende a verificarsi al di fuori dell'intervallo di tensione di modo comune di ingresso quando la corrente di bias di ingresso e corrente di polarizzazione di ingresso è prossima a zero.

Si noti che a temperature più basse, il BEB4530-1 ha un livello bassissimo di corrente di polarizzazione e il rilassamento del dielettrico determina un errore aggiuntivo che limita l'accuratezza di questo metodo. Le correnti di rilassamento dielettrico possono essere più grandi delle correnti di bias. Per questo, la misurazione deve essere eseguita ad una temperatura più elevata (125°C), alla quale la corrente di polarizzazione d'ingresso domina sugli effetti dielettrici.

Con il metodo di integrazione capacitiva, la corrente di polarizzazione d'ingresso a 125°C misura meno di 100 fA.

4.3.6 Misura ΔV_{Out} (Due Tensioni Di Uscita Di Prova)

I primi due metodi di misurazione discussi in questa dissertazione richiedono di riscaldare la scheda di valutazione a 125 °C per aumentare la corrente di polarizzazione d'ingresso a un livello misurabile. Questo metodo di misura ΔV_{OUT} consente all'utente di misurare I_{B+} (o I_{B-}) a temperatura ambiente senza una camera termica. Dunque, il metodo ΔV_{OUT} richiede due test per misurare la corrente di polarizzazione di ingresso. Il primo test misura V_{OUT1} , che corrisponde alla tensione di offset della base del BEB4530-1SI. Il secondo test misura V_{OUT2} , che è la somma della tensione di offset di base e della caduta di tensione creata da I_{B-} o I_{B+} che attraversa il resistore di retroazione o la resistenza di ingresso in serie.

Utilizzare il modello BEB4530-1SI-TIA per la misurazione di I_{B-} e il modello BEB4530-1SI-BUF per la misura di I_{B+} .

- **I_{B-} Misurazione:** La Figura 4.26 mostra uno schema per la misurazione di I_{B-} utilizzando il dispositivo BEB4530-1SI-TIA. Il DUT è impostato in una configurazione a transimpedenza e la tensione di uscita viene misurata e registrata utilizzando un multimetro a 8,5 cifre, il Keysight 3458A. Utilizzare un resistore di valore della resistenza dell'ordine dei gigaohm (G Ω) o dei teraohm (T Ω) per ottenere una tensione di uscita misurabile; per esempio, il modello BEB4530-1 è stato caratterizzato utilizzando una tensione di uscita di 1 T Ω (T Ω = 10¹² Ω), che fornisce 1 mV per fA di sensibilità.

Il BEB4530-1SI-TIA è dotato di un resistore SMT da 10 G Ω R_{F1} . Il resistore di retroazione converte I_{B-} in una tensione di uscita (V_{OUT}) pari a $V_{OUT} = I_{B-} \times \text{Feedback Resistor}$

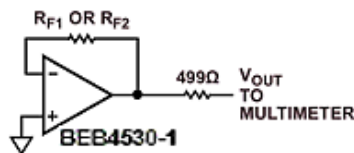


Figura 4-26: I_{B-} Schema di misurazione

Per prima cosa, stabilire la tensione di offset di base del BEB4530-1SI-TIA mettendo in cortocircuito il resistore di retroazione e misurando la tensione di uscita (V_{OUT1}) del DUT in configurazione buffer.

Quindi, rimuovere il cortocircuito e misurare la tensione di uscita con la resistenza di retroazione al suo posto. La resistenza di retroazione converte I_{B-} in una tensione di uscita

misurabile. V_{OUT2} è la somma della tensione di offset della linea di base e della caduta di tensione creata da I_{B-} che attraversa il resistore di retroazione.

Calcolando I_{B-} con

$$I_{B-} = \frac{(V_{OUT2} - V_{OUT1})}{R_{FEEDBACK}} \quad (51)$$

Seguono le procedure per l'impostazione delle misure di prova:

1. Utilizzare il BEB4530-1SI-TIA.
2. Rimuovere il coperchio di SHIELD1. Cortocircuitare il resistore di retroazione (R_{F1}) utilizzando le prese dei pin P7 e V_{OUT} .
3. Collocare il BEB4530-1SI-TIA in una scatola di metallo.
4. Collegare l'uscita del BEB4530-1SI-TIA al multimetro Keysight 3458A.

Seguono le procedure di test passo, passo per la misurazione di I_{B-} :

1. Alimentare il BEB4530-1SI-TIA:
 - a. V_+ (J3): +5 V
 - b. GND (J4): 0 V
 - c. V_- (J5): -5 V
2. Fornire il set di test per l'Agilent 3458A.
 - a. Gamma automatica: off
 - b. Intervallo manuale: 0.1 V
 - c. NPLC: 10
3. Misurare la tensione di uscita. Registrare i risultati e calcolare la tensione di uscita media (V_{OUT1}). Si noti che periodi di misura più lunghi producono una media più accurata. Una durata del test di almeno 60 secondi per tenere conto di eventuali effetti di riscaldamento.
4. Spegner l'alimentazione del BEB4530-1SI-TIA.
5. Rimuovere il cortocircuito per l'impostazione predefinita, l'amplificatore è in configurazione a transimpedenza con una resistenza di retroazione da 10 G Ω in R_{F1} .
6. Posizionare il coperchio su SHIELD1.
7. Misurare la tensione di uscita (somma della tensione di offset della scheda e della caduta di tensione dovuta al flusso di I_{B-} che attraversa la resistenza di retroazione). Registrare i risultati e calcolare la tensione media di uscita (V_{OUT2}). La durata suggerita per il test è di 300 secondi. La media riduce il rumore del resistore. Un resistore da 10 G Ω ha circa 12,8 $\mu V/\sqrt{Hz}$ di rumore termico. Con 300 secondi di dati, il rumore totale del resistore integrato è di circa 6 μV p-p. Ciò equivale a circa 0,6 fA di imprecisione di misura. Un numero maggiore di medie fornisce rendimenti decrescenti a causa all'aumento del rumore 1/f a bassa frequenza.

8. Calcolare la corrente di polarizzazione di ingresso con

$$I_{B-} = \frac{V_{OUT2} - V_{OUT1}}{10 \text{ G}\Omega} \quad (51)$$

9. L'equazione al punto 8 presuppone che il valore della resistenza di feedback è noto con precisione. Verificare questa ipotesi forzando una corrente di prova nota nel BEB4530-1SI-TIA e misurando la tensione di uscita. Il SourceMeter Keithley 2635B è stato utilizzato per immettere una corrente di 250 pA nel pin di inversione del DUT tramite J1. L'uscita dovrebbe leggere circa $250 \text{ pA} \times 10 \text{ G}\Omega = 2,5 \text{ V}$. Qualsiasi deviazione della tensione di uscita dal valore previsto è dovuta alla tolleranza della retroazione. Il resistore preassemblato da $10 \text{ G}\Omega$, R_{F1} , ha una tolleranza del 10%.

La figura 4.27 e la figura 4.28 mostrano V_{OUT1} e V_{OUT2} per un'unità campione su un intervallo di 300 secondi e i relativi valori medi.

La figura 4.29 mostra l' I_{B-} calcolato. La figura 4.30 mostra il valore medio misurato della resistenza di retroazione, R_{F1} . Il valore della resistenza è all'interno della sua tolleranza del 10%.

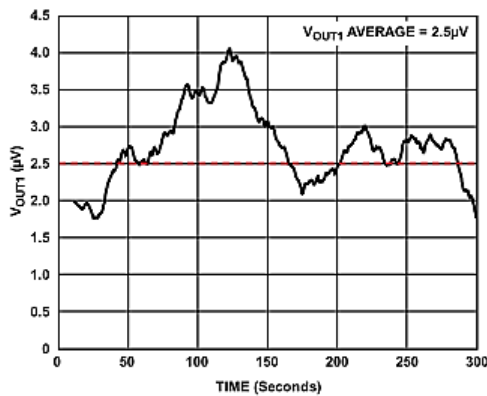


Figura 4-27: V_{out1} vs Time

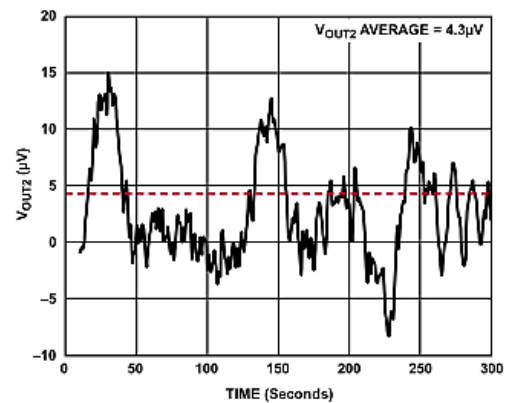


Figura 4-29: V_{out2} vs Time

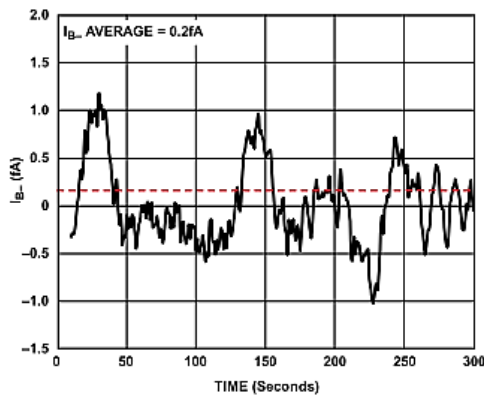


Figura 4-28: I_{B-} vs Time

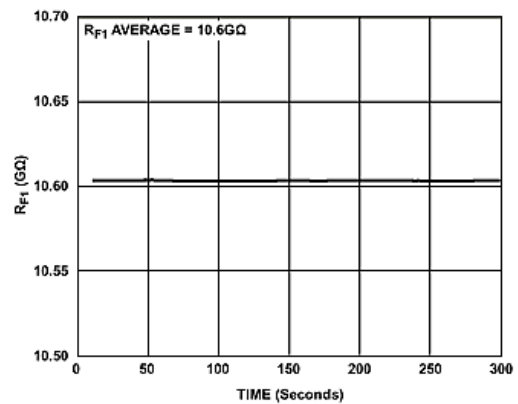


Figura 4-30: Resistenza di retroazione (R_{F1}) misurata rispetto al tempo

Questo metodo di misurazione può essere eseguito anche con resistenze di retroazione di valore maggiore. Questi resistori di valore elevato sono spesso incapsulati in vetro, sigillati ermeticamente e di grandi dimensioni.

L'uso di una resistenza di retroazione di valore più elevato consente di ottenere un migliore rapporto segnale/rumore in uscita e una maggiore precisione. Il modello BEB4530-1SI-TIA dispone di prese a pin che consentono l'utilizzo di resistenze a foro passante (R_{F2}) come la Ohmite RX-1M ad altissima resistenza, elevata stabilità e sigillato ermeticamente.

Quando si utilizzano queste resistenze a foro passante di grande valore, rimuovere R_{F1} , che è configurata sulla BEB4530-1SI-TIA. Dopo la rilavorazione, pulire l'unità BEB4530-1SI-TIA secondo le istruzioni riportate nella sezione Pulizia e manipolazione prima di effettuare qualsiasi misura. Inserire la resistenza a foro passante grande tra P7 e V_{OUT} e misurare I_{B-} ripetendo le stesse operazioni descritte in questa sezione. Modificare l'entità della corrente che viene immessa nel DUT al punto 9.

- **I_{B+} Misurazione:** Per la misurazione di I_{B+} utilizzare il dispositivo BEB4530-1SI-BUF. Questo metodo di misurazione è simile al metodo di misurazione descritto nella sezione Misurazione I_{B-} . Vedere la figura 4.31 per lo schema di misurazione di I_{B+} . La resistenza in serie di ingresso converte I_{B+} in una tensione di uscita (V_{OUT}) a J2, dove:

$$V_{OUT} = I_{B+} \times \text{Input Series Resistor}$$

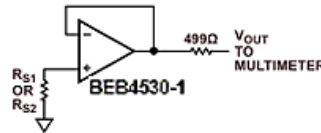


Figura 4-31: I_{B+} Schema di misurazione

Stabilire la tensione di offset di base di BEB4530-1SI-TIA cortocircuitando il pin non invertente del DUT verso massa. A tal fine collegare un filo dalle prese dei pin P7 a P4 (GND).

La tensione base di offset è V_{OUT1} . Rimuovere il cortocircuito e misurare la tensione di uscita tensione di uscita con la resistenza in serie di ingresso inserita. Se si preferisce si possono assemblare un 1206 o 1210 in corrispondenza di R_{S1} , oppure utilizzare una grande resistenza passante dalle prese dei pin P7 a P4 (GND). La serie di ingresso converte I_{B+} in una tensione di uscita misurabile. V_{OUT2} è la somma della tensione di offset della linea di base e della caduta di tensione creata dal flusso di I_{B+} che attraversa il resistore in serie di ingresso. Calcolare I_{B+} con

$$I_{B+} = \frac{V_{OUT2} - V_{OUT1}}{\text{INPUT SERIES RESISTOR}} \quad (52)$$

4.4 Conclusioni

Il BEB4530-1 è un amplificatore di tipo elettrometrico con una corrente di polarizzazione d'ingresso di livello di femtoampere. Nel presente capitolo sono stati descritti tre metodi per misurare la corrente di polarizzazione d'ingresso a livello di femtoampere: misurazione con il Keithley 2635B, misurazione di integrazione capacitiva e misurazione ΔV_{OUT} (tensione di uscita a due test).

1. Il metodo di misura Keithley 2635B è una misura diretta di I_{B+} utilizzando il SourceMeter Keithley 2635B. Questo metodo di test utilizza solo uno strumento calibrato per la misura della corrente di bias di ingresso. Tuttavia, poiché la corrente di polarizzazione di ingresso del DUT è estremamente bassa (<1 fA), è impossibile misurare accuratamente I_B a temperatura ambiente. Il DUT deve essere riscaldato per aumentare I_B a un valore misurabile. Questo metodo richiede quindi una camera di simulazione, un cavo triax con temperatura massima di 125°C e il SourceMeter Keithley 2635B. Pertanto, il costo di installazione è elevato a fronte di una semplice misura diretta.
2. Il metodo dell'integrazione capacitiva calcola I_B misurando la variazione della tensione di uscita dell'amplificatore nel tempo con una capacità d'ingresso nota. Questa misura può essere senza un'unità di misura della sorgente di alto livello (SMU) e richiede solo un multimetro per monitorare la tensione di uscita; tuttavia, il tempo di configurazione è lungo. Per calcolare la corrente di polarizzazione d'ingresso, è necessario conoscere il valore della capacità totale d'ingresso. Pertanto, la capacità di ingresso deve essere misurata prima del test di integrazione. Questo metodo di misura prevede lo scollegamento manuale dei fili per evitare di utilizzare relè con bassa resistenza di isolamento e richiede una camera di simulazione per riscaldare il DUT e aumentare I_B a un livello misurabile. Inoltre, I_B non è costante rispetto alla tensione di ingresso di tensione di modo comune. Inoltre, è possibile calcolare I_B solo per un breve periodo di tempo durante il quale è possibile calcolare I_B con il metodo di misura dell'integrazione capacitiva.
3. Il metodo di misurazione ΔV_{OUT} (tensione di uscita a due test) richiede due test per misurare la corrente di polarizzazione in ingresso. Il primo misura V_{OUT1} , che corrisponde alla tensione di offset del BEB4530-1SI-TIA. Il secondo test misura V_{OUT2} , che è la somma della tensione di offset della linea di base e della caduta di tensione creata da I_{B-} o I_{B+} che attraversa la resistenza di retroazione o di ingresso

attraverso il resistore di retroazione o di ingresso in serie. L'impostazione è rapida e il costo è contenuto. Il BEB4530-1SI-TIA è configurato con una resistenza da 10 G Ω . e la misura può essere effettuata con un multimetro. Tuttavia, per ottenere una misura più accurata, si può scegliere di utilizzare un resistore di retroazione o di ingresso in serie di valore maggiore. Questi resistori di grande valore sono spesso incapsulati in vetro e sigillati ermeticamente, consentendo di raggiungere un elevato grado di precisione e stabilità. In compenso, i loro costi sono tipicamente elevati. Questi resistori richiedono inoltre una straordinaria pulizia e procedure speciali, e devono essere maneggiati solo dai terminali per evitare la contaminazione.

CONCLUSIONI

È stato sviluppato un sistema di spettroscopia di Bio-Impedenza in tempo reale con circuiti di lettura ad alta linearità per sensori elettrochimici, Label-Free, Label-Based e un software di facile utilizzo per rilevare comodamente gli analiti in tempo reale e caricare i dati in un database locale o su server remoto. Il personale scientifico da remoto può facilmente ottenere i dati rilevati via Internet dal database e colloquiare direttamente con il dispositivo tramite protocollo su webserver. I circuiti di lettura proposti sono stati fabbricati in tecnologia FinFETs da 10 nm.

È stata implementata una MCU basata su FPGA per filtrare i disturbi indesiderati e gestire il consumo di energia del sistema. Sono stati condotti esperimenti elettrochimici per verificare la fattibilità dell'integrazione del sistema proposto con un SourceMeter Keithley 2635B.

Il sistema proposto presenta un'elevata linearità con valore R^2 superiore a 0,99, dimensioni ridotte (5,6 cm x 8,7 cm) e un'elevata integrazione.

È stata implementata una campagna di crowdfunding (<https://experiment.com/projects/tjsjcgvfxdzxqtwidriq>) per consentire l'avvio e la realizzazione di parte delle componenti del progetto BioFEVI, inoltre è stato implementato il sito web (biofevi.weebly.com) e la stampa di locandine finalizzata alla raccolta dei fondi che hanno contribuito a velocizzare in maniera notevole la realizzazione della fase 1 di questo progetto.

Si precisa che nella presente dissertazione per motivi di brevetto non è stata riportata alcuna specifica significativamente rilevante in merito alla reale architettura del sistema BioFEVI, pertanto si fa riferimento solo alla Fase 1 dell'intero progetto, le restanti 3 fasi verranno poste in essere dallo scrivente solo dopo previo accordo con l'università degli studi della Tuscia.

Ringraziamenti

Un particolare ringraziamento va al Dr. Ben Retamal della Collaborative Drug Discovery Inc. (Nine Hills Road Cambridge, CB2 1GE United Kingdom Phone: +44 (0) 1223 803830 Mob: +44 7771 358 212, Skype: ben.retamal, e-mail: bretamal@collaborativedrug.com), per il supporto fornito nella realizzazione del sistema software (GUI) e relativi protocolli d'interfaccia per la comunicazione con il sistema di repository dati "CDD Vault".

Per la parte medico-scientifica si ringrazia il Team medico del Policlinico Umberto 1° di Roma, Prof. Giuseppe Attanasio ^c, Prof. Antonio Greco ^d, Prof. Massimo Ralli ^e, Dr. Francesca Yoshie Russo ^f, Dr. Carlo Cavaliere ^c Per aver contribuito significativamente alla stesura delle linee guida e protocollo medico che ha permesso lo sviluppo dell'architettura del progetto BioFEVI quale sistema di supporto per specifici settori della ricerca e della diagnostica medica.

^c D. A. I. Testa-Collo, unità di Otorinolaringoiatra, Policlinico Universitario Umberto 1° Roma, Università Sapienza.

^d D. A. I. Testa-Collo, unità di ORL, Unità Operativa Complessa di Audiologia, DU organi di senso, Policlinico Universitario Umberto 1° Roma, Università Sapienza.

^{e,f} SSD MED/31 Otorinolaringoiatria, Dipartimento di Organi di Senso, Sapienza Università di Roma.

BIBLIOGRAFIA

- Amini M., Hisdal J., Kalvøy H. “Applications of bioimpedance measurement techniques in tissue engineering”, J. Electr. Bioimpedance, 2018.
- Anumolu R. and L. F. Pease III, “Rapid Nanoparticle Characterization, Nanotechnology and Nanomaterials”, The Delivery of NPs, 2012.
- Bagnaninchi PO., Drummond N., “Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing”, Proc Natl Acad Sci, 2011.
- Bard A., Faulkner L., “Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications”, 2nd ed. Wiley-Interscience, 2000.
- Boffetta Paolo MD, MPH, D. Maxwell Parkin MD “Cancer in developing countries”, CA, 1994.
- Bonato Paolo “Wearable Sensors and Systems”, IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine (Volume: 29, Issue: 3, May-June 2010).
- Bonuglia V., G. Attanasio, C. Cavaliere, “Dynamic analysis of apoptosis in viral cochlear and rhino pharyngeal infections”, Bio-FEVI Genomic Project, Pre-miRNA Devices of, Protocollo medico di ricerca e Pianificazione R&S Prototipi avanzati e innovativi, 2021.
- Brackena C. P., Gregorya P. A., Khew-Goodalla Y., Goodall G. J., “The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition”, Cellular and Molecular Life Sciences, 2009.
- Carter PJ. “Potent antibody therapeutics by design”, Nat Rev Immunol, 2006.
- Crider KS., Yang TP., Berry RJ., Bailey LB., “Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate’s role”, Adv Nutr, 2012.

- Della Corte Dennis, Hugo L. van Beek, Falk Syberg, Marcus Schallmeyer, Felix Tobola, Kai U. Cormann, Christine Schlicker, Philipp T. Baumann, Karin Krumbach, Sascha Sokolowsky, Connor J. Morris, Alexander Grünberger, Eckhard Hofmann, Gunnar F. Schröder & Jan Marienhagen “Engineering and application of a biosensor with focused ligand specificity”, NC, 2020.
- Enz C. and Temes G. C., “Circuit techniques for reducing the effects of op-amp imperfections: autozeroing, correlated double sampling, and chopper stabilization”, Proceedings of the IEEE, 1996.
- Fan Zhang, Tongyu Jin, Qingqing Hu, PingangHe, “Distinguishing skin cancer cells and normal cells using electrical impedance spectroscopy”, Journal of Electroanalytical Chemistry, 2018.
- Fleischer T., Oslo Breast Cancer Research Consortium (OSBREAC) Tekpli X., Mathelier A., Wang S., Nebdal D., Dhakal H.P., Sahlberg K.K., Schlichting E., Børresen-Dale A.-L., et al. “DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages”, Nat. Commun, 2017.
- Foltz IN et al. “Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know”, Circulation 2013.
- Francisco Figueirido, Gabriela S. Del Buono, and Ronald M. Levy, “On Finite-Size Corrections to the Free Energy of Ionic Hydration”, J. Phys. Chem. 1997.
- Fumagalli L., Ferrari G., Sampietro M., and Gomila G., “Quantitative nanoscale dielectric microscopy of single-layer supported biomembranes”, Nano Lett., 2009.
- G Christofori, H Semb, “The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene”, Trends Biochem Sci, 1999.
- G. Ferrari, F. Gozzini, A. Molari, and M. Sampietro, “Transimpedance amplifier for high sensitivity current measurements on nanodevices,”, Solid-State Circuits, 2009.
- Gelain M.E., università di Padova, “Citologia 4”, 2014.
- George A. CalinMD, Yuri Pekarsky, Carlo M.CroceMD, “The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia”, Best Practice & Research Clinical Haematology, 2007.
- Gozzini F., Ferrari G., and Sampietro M., “Linear transconductor with rail-to-rail input swing for very large time constant applications”, Elec-tronics Letters, 2006.

- Grovera, W.H.; Bryana, A.K.; Diez-Silvac, M.; Sureshb, S.; Higgins, J.M.; Manalis, S.R. “Measuring single-cell density”, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2011.
- Heitzer E., Perakis S., Geigl J.B., Speicher M.R. “The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer”, *NPJ Precis*, 2017.
- Henry N. Lynn, Daniel F.Hayes “ Cancer biomarkers”, *Molecular Oncology*, 2012.
- Igreja R. and Dias C., “Analytical evaluation of the interdigital elec-trodes capacitance for a multi-layered structure”, *Sensors and Actuators A: Physical*, 2004.
- Intisar E. Saeed, Hsin-Yi Weng, Kamal H. Mohamed, Sulma I. Mohammed “Cancer incidence in Khartoum, Sudan: first results from the Cancer Registry, 2009–2010”, *Cancer Medicine* 2014.
- Ismail, Said Ibrahim, Soubani, Majd, Nimri, Jena Monther, Al-Zeer, Ali Hazem “Cancer Incidence in Jordan from 1996 to 2009 - A Comprehensive Study”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013.
- Jabłoński, Aleksander, “Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes”, *Nature* 1933.
- Javier Rodriguez-Falces, “A novel approach to teach the generation of bioelectrical potentials from a descriptive and quantitative perspective”, *Adv Physiol*, 2013.
- Jiang C., Chen X., Alattar M., Wei J., Liu H., “MicroRNAs in tumorigenesis, metastasis, diagnosis and prognosis of gastric cancer”, *Cancer Gene Therapy* 2015.
- Jasmina Vidic, Marisa Manzano, Chung-Ming Chang & Nicole Jaffrezic-Renault “Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry”, *VR*, 2017.
- Jinhee Kang, John Wen, Shesha H. Jayaram, Aiping Yu, Xiaohui Wang “Development of an equivalent circuit model for electrochemical double layer capacitors (EDLCs) with distinct electrolytes”, *Electrochimica Acta*, 2014.
- Kristen M. Carr, Kevin Rosenblatt, Emanuel F. Petricoin & Lance A. Liotta “Genomic and proteomic approaches for studying human cancer: Prospects for true patient-tailored therapy”, *Human Genomics*, 2004.
- Lang Walter, Frank Jakobs, Elena Tolstosheeva, Hannes Sturm, Azat Ibragimov, Antonia Kesel, Dirk Lehmhus, Ursula Dicked “D Rapid Sensory Profiling Techniques”, *Sensors and Actuators A: Physical*, 2021.

- Li, T.; Yang, M.H. “Electrochemical sensor utilizing ferrocene loaded porous polyelectrolyte nanoparticles as label for the detection of protein biomarker IL-6”, *Sens*, 2011.
- Linares-Barranco B. and Serrano-Gotarredona T., “On the design and characterization of femtoampere current-mode circuits,” *Solid-State Circuits*, 2003.
- Lipman NS et al., “Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources”, *ILAR J*, 2005.
- Mack GS. “MicroRNA gets down to business”, *Nature Biotechnology*, 2007.
- Manolis T. T. and Meyer R. G., “Noise in current-commutating CMOS mixers,” *Solid-State Circuits*, 1999.
- Marek Mraz, Marek Mraz, Sarka Pospisilova, Karla Malinova, Ivo Slapak & Jiri Mayer, “MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes”, *Oncogen*, 2014.
- Maya Ghossaini, Paul D.P. Pharoah, Douglas F. Easton, “Inherited Genetic Susceptibility to Breast Cancer: The Beginning of the End or the End of the Beginning?”, *The American Journal of Pathology*, 2013.
- McCoy MH and Wang E., “Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time”, *J Virol Methods*, 2005.
- McMahon Gillian “Analytical instrumentation: a guide to laboratory, portable and miniaturized instruments”, *Wiley* 2008.
- Norde W., “Adsorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces”, *Cells Mater*, 1986.
- Patrícia Carneiro, Maria Sofia Fernandes, Joana Figueiredo, Joana Caldeira, Joana Carvalho, Hugo Pinheiro, Marina Leite, Soraia Melo, Patrícia Oliveira, Joana Simões-Correia, Maria José Oliveira, Fátima Carneiro, Céu Figueiredo, Joana Paredes, Carla Oliveira, Raquel Seruca, “E-cadherin dysfunction in gastric cancer - Cellular consequences, clinical applications and open questions”, *Volume 586*, 2012.
- Piersma B. J. and Gileadi E., “in *Modern Aspects of Electrochemistry*”, *Plenum Press*, 1966.
- Plunger B, Choi CK, Sparer TE., “Electrical cell-substrate impedance sensing for measuring cellular transformation, migration, invasion, and anticancer compound screening”, *Cancer Metastasis - Biol. Treat.*, 2012.

- Qureshi A, Thakur N, Monga I, Thakur A, Kumar M., “VIRmiRNA: a comprehensive resource for experimentally validated viral miRNAs and their targets”, Database, 2014.
- Rabe M.; Verdes D.; Seeger S., “Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces”, *Adv. Colloid Interface Sci.* 2011.
- Ramesh Singh & Yin-Yuan Mo “Role of microRNAs in breast cancer”, *Cancer Biology & Therapy*, 2013.
- Schramke V et al., “Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing”, *Science*, 2003.
- Seema Sethi, Shadan Ali, Philip A. Philip, Fazlul H. Sarkar “Clinical Advances in Molecular Biomarkers for Cancer Diagnosis and Therapy”, *Molecular Sciences*, 2013.
- Smedt De L., Lemahieu J., Palmans, S. et al. “Microsatellite instable vs stable colon carcinomas: analysis of tumour heterogeneity”, *inflammation and angiogenesis*, 2015.
- Sun X, Jiao X, Pestell T G, Fan C, Qin S, Mirabelli E, Ren H & Pestell R G, “MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield”, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007.
- Surani M.Azim, Katsuhiko Hayashi, Petra Hajkova “Genetic and Epigenetic Regulators of Pluripotency”, *Cell*, 2007.
- Volpe TA et al, “Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi”, *Science*, 2002.
- Wakamori, M. et al., “Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation”, *Sci. Rep.* 5, 2015.
- Wang, J., “Analytical Electrochemistry”, 3rd ed. John Wiley & Sons, 2006.
- Wei Gu and Robert G. Roeder, “Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain”, *Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology The Rockefeller University*, 1997.
- Wittekind C. Neid M., “Cancer Invasion and Metastasis”, *Oncology* 2005.
- Wu J., Feeder G., and Carley L., “A low-noise low-offset capacitive sensing amplifier for a 50 μg / $\sqrt{\text{Hz}}$ monolithic cmos mems accelerometer”, *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 2004.

- Xiong, W.; Wu, S.F.; Liao, F.S.; Hong, N.; Fan, H.; Wei, G.B., “A ZnS-Nanoparticle-Label Based Electrochemical Codeine Sensor”, In *Applied Mechanics and Materials*, 2017.
- Xu J., Fan Q., Huijsing J. H., Van Hoof C., Yazicioglu R. F., and Makinwa K. A., “Measurement and analysis of current noise in chopper amplifiers”, *Solid-State Circuits*, 2013.
- Yang J, Ji WY, Qu YR, He LX, Zhao XD, Jin MZ., et al. “DNA methylation and histone modification relate to RASSF1A gene deletion in laryngeal carcinoma tissues”, 2011.
- Yoshihiro Yamaguchi, Hirofumi Nariya, Jung-Ho Park & Masayori Inouye, “Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference”, *Nature Communications* volume 3, 2012.
- Yumiao Han & Benjamin A Garcia “Combining genomic and proteomic approaches for epigenetics research”, *Future Medicine*, 2013.
- Zola, Heddy, Thomas, Daniel, and Lopez, “Monoclonal Antibodies: Therapeutic Uses”, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2013.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI DA FINALIZZARE NELLA FASE DI TEST PARZIALI (ID13.1) DEL PROGETTO BIOFEVI

Bonuglia V., G. Attanasio, C. Cavaliere, “Dynamic analysis of apoptosis in viral cochlear and rhino pharyngeal infections” Bio-FEVI Genomic Project, Pre-miRNA Devices of, Protocollo medico di ricerca e Pianificazione R&S Prototipi avanzati e innovativi, ID03.1, pp. 1–22, 2021.

Bonuglia V., Gabbianelli F. Milanesi M., Pelosi. Claudia, “A new hydrogel biosensor for high selective and sensitive detection of $A\beta$ -oligomers” Bio-FEVI Genomic Project, , ID13.1, pp. 1–, 2022.

ELENCO DELLE CERTIFICAZIONI E PROGETTI REALIZZATI

Certificate presented to Valeriano Bonuglia, “Simplifying oligonucleotide characterisation with Microchip CE-MS”, European Pharmaceutical Review, Dec 2, 2021.

Sottosistemi di potenza e controllo sviluppati da Valeriano Bonuglia, inerenti a “Progetto BES/T (Building Efficiency System by Television)”, Università della TUSCIA, 2020.