



NANOBIOROBOT OLTRE LA FANTASCIENZA

Siamo ormai in grado di realizzare sistemi ibridi nano-strutturati con un vasto spettro di potenziali applicazioni in biomedicina

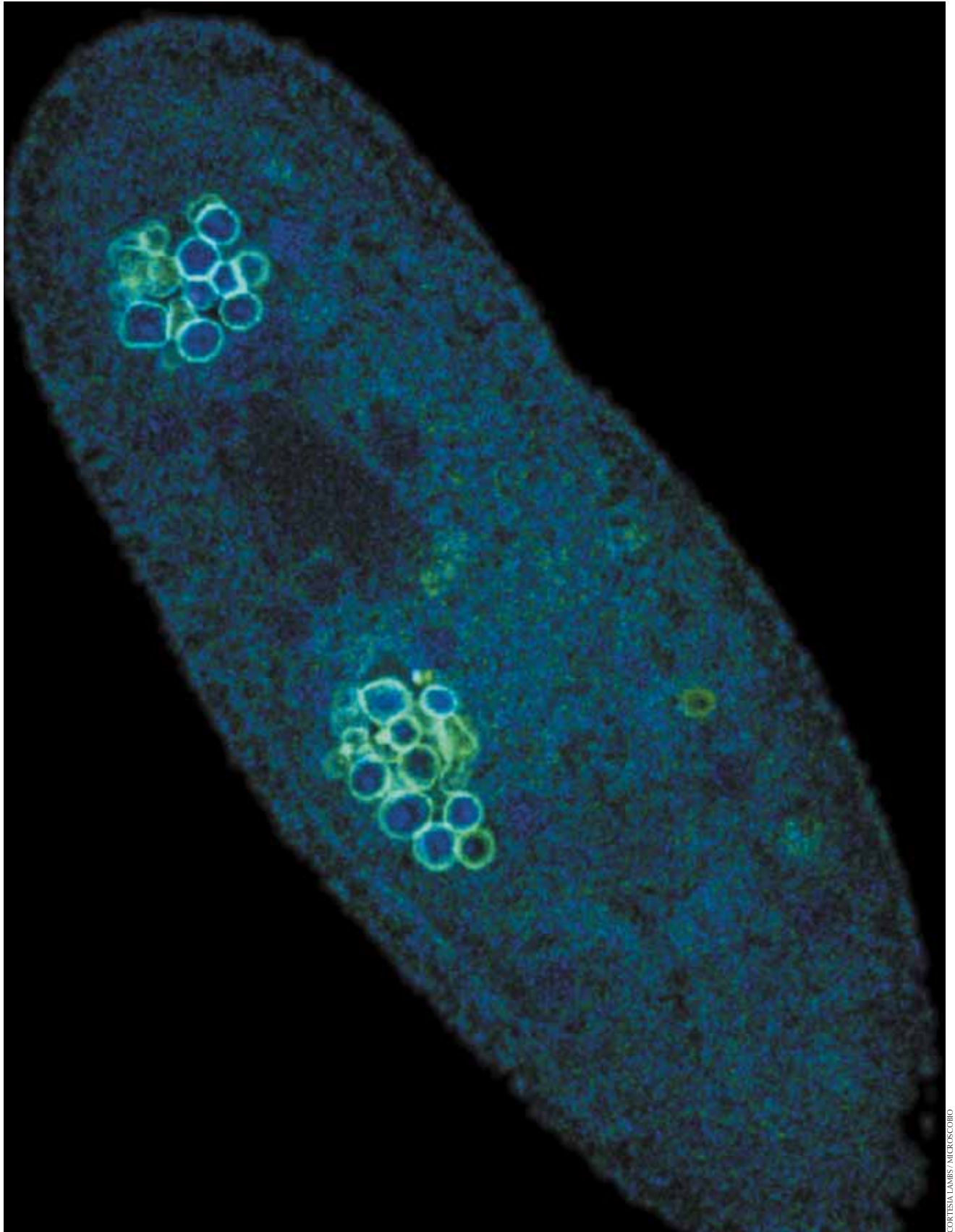
ALBERTO DIASPRO

L TERMINE NANOBIOROBOT è un neologismo qui utilizzato per indicare un sistema ibrido artificiale-naturale progettato e realizzato per svolgere attività specifiche in modo ripetitivo, efficiente e flessibile, ad alto livello di parallelismo. Questo sistema può essere considerato un *robot* per la sua capacità di svolgere azioni specifiche in modo programmato. È di tipo *bio* poiché si avvale di un sistema decisionale e produttivo di tipo biologico. È classificabile come *nano* in quanto permette di realizzare un controllo a livello molecolare, o nanometrico, per attuare meglio e specializzare le proprie attività, e per proteggere e rendere più flessibile il sistema biologico integrato.

La definizione di robot, inteso come congegno che mima le azioni di un uomo, ha radici lontane, ma il termine si fa attendere fino al 1920, per bizzarra coincidenza anno di nascita di Isaac Asimov. In quell'anno il drammaturgo cecoslovacco Karel Capek scrive *R.U.R. (Rossum's Universal Robots)*, un testo teatrale in cui il protagonista produce in serie esseri umani artificiali destinati a liberare l'uomo dai lavori più faticosi, in modo di permettergli un'esistenza più confortevole. Capek usa per questi esseri artificiali proprio la parola robot, che in cecoslovacco significa «lavoratore forzato» o «schiavo».

Ma i robot cominciano ben presto a provare emozioni ovvero a sottrarsi al controllo e al dominio dei propri creatori e questo porta a innescare nel pubblico un senso di pericolo ogni qual volta se ne parli. Sarà Asimov, nel 1942, a riportare serenità sull'argomento introducendo nel racconto *Circolo vizioso*¹ le tre leggi fondamentali della robotica² impresse nel cervello positronico di queste macchine. Nonostante Asimov, l'evoluzione artificiale nel XXI secolo vede riproposto un senso di diffidenza e di insicurezza verso i nuovi esseri artificiali prodotti dall'uomo, grazie alle scoperte e agli avanzamenti tecnologici nelle nanotecnologie e nelle nanoscienze³. Non a caso gli esseri artificiali di *Viaggio allucinante* hanno come contraltare lo sciame di micro-robot descritto da Michael Crichton in *Preda*, dove il sistema robotico sfugge al controllo degli scienziati e oltre a riprodursi avvia un attacco contro l'uomo.

Le nanotecnologie offrono comunque la possibilità di progettare, costruire e utilizzare dispositivi di dimensioni estremamente ridotte, nell'ordine delle decine o centinaia di nanometri, ossia miliardesimi di metro, dispositivi migliaia di volte più piccoli del diametro di un capello umano. A questo livello nanoscopico, dove c'è ancora molto da comprendere e sperimentare, sarà possibile controllare l'intima organizzazione della materia per realizzare sistemi fortemente specializza-



CORTESIA LABS/ MICROSCOPIO

Immagine multifotonica di un organismo unicellulare, *Paramecium primaurelia*, ospitante cellule di lievito di cui è visibile il DNA marcato in blu, incapsulate in matrice di polielettroliti evidenziata tramite la fluorescenza indotta nel suo guscio.

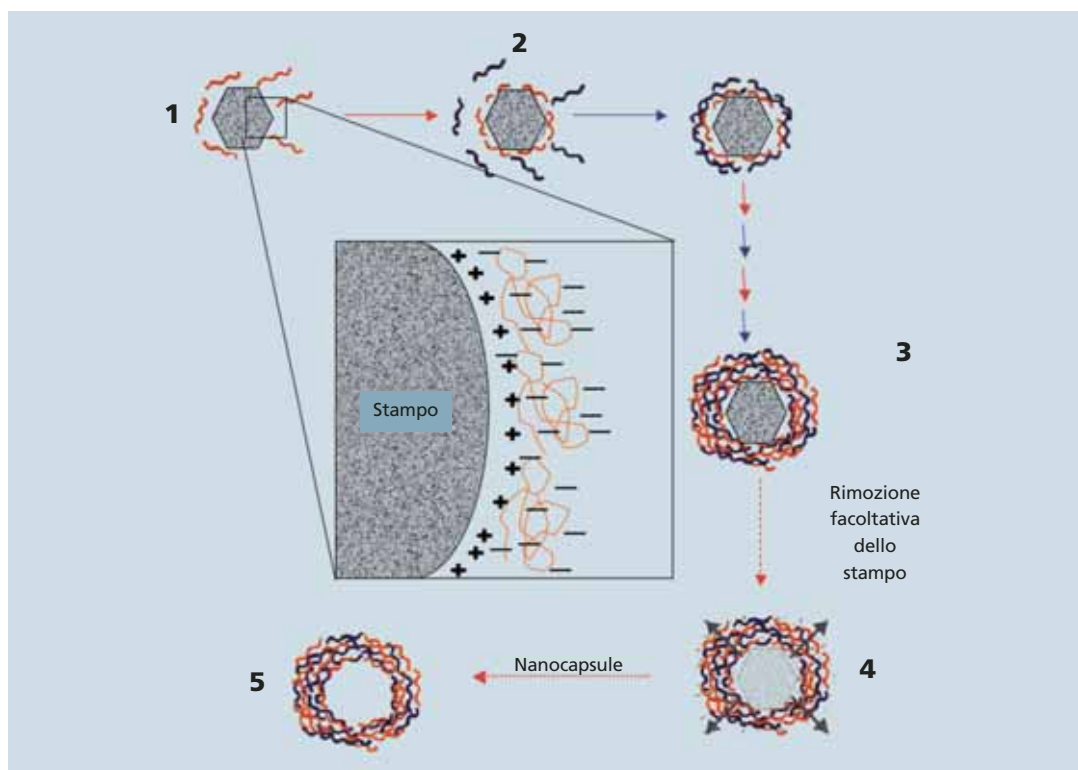


Figura 1. Schema di realizzazione di una nanocapsula. Su uno stampo superficialmente carico (riquadro centrale) polielettroliti di carica opposta sono ripetutamente adsorbiti (passi I e II) fino a ottenere un «guscio» di spessore, di carica e di permeabilità appropriate (III). Lo stampo può essere preservato e protetto dal guscio oppure può essere rimosso (IV) per realizzare una nanocapsula vuota (V), che successivamente può essere riempita e svuotata controllandone la permeabilità.

ti. L'anno di nascita delle nanotecnologie, termine reso popolare nel 1981 da Eric Drexler per definire una tecnologia a livello molecolare ⁴, coincide con una prolusione di Richard Feynman tenuta nel 1959. «C'è un sacco di spazio laggiù in fondo» recitava il titolo della conferenza ⁵. Quel discorso può essere considerato come una sorta di manifesto per le odierne nanoscienze. Oggi, dopo anni di intensa attività di ricerca, siamo in grado di realizzare sistemi ibridi nano-strutturati a base di catene polimeriche e cellulari per realizzare bio-fabbriche, per aumentare la comprensione dei meccanismi vitali dei sistemi biologici, per condurre esperimenti a livello molecolare, per somministrare farmaci in modo intelligente, per addestrare sistemi biologici a riparare altri sistemi biologici. Sono stati fatti progressi incredibili in biologia molecolare e cellulare, così come nella chimica dei colloidali e in altre aree, dominio della fisica e dell'ingegneria. Come nel *Viaggio allucinante*, si sta cercando di realizzare nanodispositivi capaci di perlustrare l'interno dell'organismo, come avviene nel videogioco *Brain wave, battle for the mind* ⁷ dove nanorobot distruggono cellule tumorali nel cervello umano.

Oggi il ricercatore israeliano Ehud Shapiro ha potuto dimostrare che robot costituiti da poche molecole possono effettivamente essere realizzati in questa prospettiva ⁸. Il suo prototipo di nanocomputer misura pochi nanometri ed è programmato per leggere l'RNA cellulare e scoprire quei difetti che possono indicare una prossima attività tumorale. Secondo Shapiro questi dispositivi potrebbero essere operativi tra una decina d'anni, con la prospettiva di introdurli nel circolo sanguigno dove potrebbero analizzare le cellule una per una, senza interferire con le normali funzioni dell'organismo, e individuare eventuali alterazioni. Una sola goccia d'acqua o di sangue può contenere circa un miliardo di nanorobot, i successori delle prime macchine molecolari ⁹, che oggi includono anche dispositivi a movimentazione bipede a base di DNA ¹⁰.

Cellule incapsulate

In questo scenario dalle molteplici e fantastiche applicazioni basate sul controllo nanoscopico si sviluppano i nanobiorobot, che sfruttano due processi che sono alla base della formazione di sistemi sopra-

CORTESIA LAMIS / MICROSCOBIO



Figura 2. Strutture a base di carbonato di calcio utilizzate come stampi per dare forma alle nanocapsule. In funzione delle modalità di preparazione si possono ottenere forme sferiche (A), a nocciolina (B) o romboedriche (C).

molecolari: il primo, largamente diffuso in natura, è basato sulle interazioni deboli che si instaurano spontaneamente tra molecole, così che l'aggregazione avviene in modo da non distruggere né formare i cosiddetti legami covalenti. Il secondo, che diremmo più artificiale, sfrutta anche reazioni in grado di forzare nuovi legami tra le molecole¹¹. Nel nostro caso la macchina è costituita da cellule biologiche geneticamente modificate e confinate in una matrice costituita da polimeri carichi, che hanno caratteristiche controllabili su scala nanometrica¹². I nanobiorobot sono dunque costituiti di cellule incapsulate in matrici di polielettroliti, note come nanocapsule¹³, e agiscono da fabbriche di bioprodotto come proteine ed enzimi, con la proprietà di offrire un rilascio controllabile. In questa fase si sta lavorando su cellule di lievito – *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae* – programmate geneticamente per l'espressione e il rilascio di proteine o prodotti specifici. Il sistema è completato da superfici nano e microstrutturate che consentono di vincolare i nanobiorobot e di raccoglierne i prodotti, ad esempio proteine o enzimi.

La messa a punto di una tecnica planare per la costruzione di film di spessore nanometrico di polielettroliti, ovvero polimeri carichi – tecnica nota come *Layer by Layer*, «strato per strato»¹⁴ – e la sua estensione alla realizzazione di strutture a base di polielettroliti organizzati tridimensionalmente in modo *fuzzy*¹⁵ (non predeterminato), hanno creato le condizioni per costruire una nuova generazione di colloidali con spessore e permeabilità controllate a livello nanometrico, base di partenza per la realizzazione dei nanobiorobot.

Le modalità di realizzazione di una nanocapsula, illustrate in figura 1, sono relativamente semplici, mentre è più complicata la loro progettazione. Un oggetto, dotato di carica superficiale, viene ricoperto in modo completo ma disomogeneo da una matrice polimerica che si autoassembla partendo da una matrice di polimeri carichi di segno opposto. Dopo questo passaggio si può immaginare come l'oggetto iniziale, che chiameremo stampo, abbia

cambiato carica. A questo punto viene avvolto da una matrice polimerica di carica opposta rispetto alla precedente e il processo è ripetuto fino all'ottenimento del numero di strati progettato. Questa caratteristica, insieme alle modalità di avvolgimento, determina la permeabilità molecolare e lo spessore dell'oggetto finale.

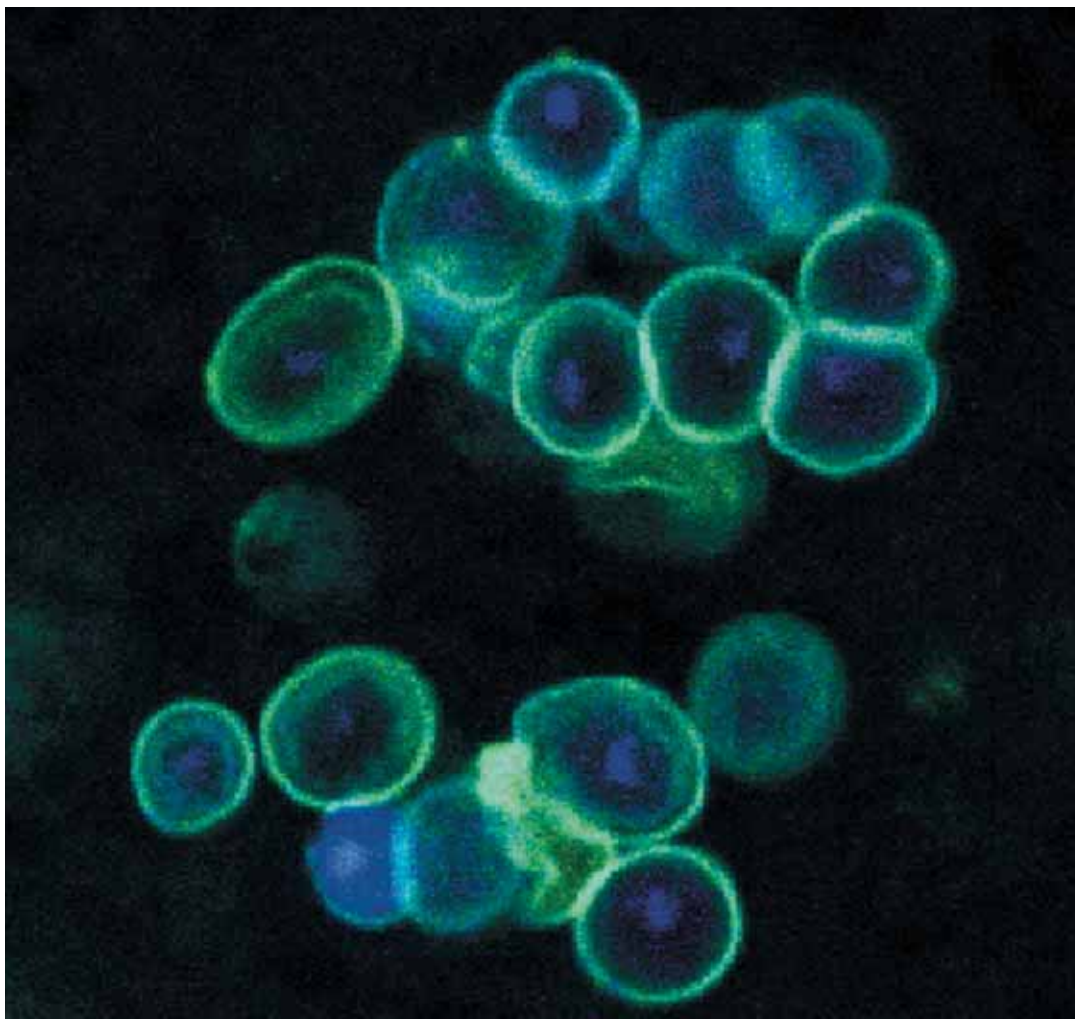
Versatili forme

Il termine nanocapsula si deve al fatto che lo spessore è controllabile strato per strato, tra gli 1,5 e i 2,5 nanometri ciascuno. L'oggetto avvolto nella matrice di polielettroliti può quindi avere dimensioni variabili da qualche decina di nanometri fino a centinaia di micrometri. Un aspetto che ha reso interessanti le nanocapsule è la possibilità di rimuovere lo stampo a fasciatura avvenuta. La permeabilità del guscio di polielettroliti, una volta eliminato lo stampo, dipende dal pH circostante. Si può immaginare il guscio appena realizzato come costituito da pori che si allargano e si restringono in relazione alle condizioni ambientali in cui si trovano. Abbiamo quindi ottenuto gusci di polimeri che si possono riempire e svuotare facendo permeare le molecole di interesse attraverso una parete di cui siamo in grado di controllare lo spessore e la porosità a livello nanometrico.

Questo sistema potrà consentire di trasportare un farmaco, visto che nell'ultimo strato delle pareti della nanocapsula si può inserire un riconoscitore biologico o artificiale di bersaglio, ovvero realizzare un sistema ligando-recettore o un agonista farmacologico su bersaglio farmacologico.

Una serie di esperimenti sono stati dedicati alla messa a punto di uno stampo ionico che fosse non tossico, di facile preparazione e relativamente economico¹⁶. L'individuazione del carbonato di calcio è stato un passo prezioso in quanto con questo materiale si possono ottenere una varietà di forme (figura 2).

L'importanza della versatilità delle forme risiede nel fatto che si possono realizzare «navicelle» di forme differenti adatte ad ambienti particolari e che,



CORTESIA LABS. NICU SACCOBIO

Figura 3. Nanocapsule contenenti cellule di lievito di cui si è evidenziato il DNA in blu.

più tecnicamente, è possibile ottimizzare il sistema colloidale per diversi rapporti di superficie-volume. Poiché l'unica limitazione nella scelta dello stampo è che esso sia carico, se ne possono usare moltissimi tipi, tra cui cellule emopoietiche fissate, cristalli ionici, sonde fluorescenti cristallizzate o aggregati di proteine. Inoltre le capsule possono essere utilizzate come gusci protettivi per isole pancreatiche¹⁷, per cellule viventi^{13,18}, per materiale per trapianti¹⁹ o per tessuti artificiali che in questo modo non vengono riconosciuti e attaccati dal sistema immunitario. In particolare per i trapianti, l'incapsulamento di interi tessuti o di singole cellule è una tecnica molto promettente e quindi si stanno studiando diversi tipi di polielettroliti e diversi tipi di cellule modello²⁰. Ovviamente resta ancora molta sperimentazione da fare per arrivare all'efficacia sull'uomo, ma la strada intrapresa sembra promettente.

Nanofabbriche

Esperimenti compiuti utilizzando come stampo il comune lievito da panettiere *Saccharomyces cerevisiae* hanno indicato come sia possibile non solo incapsulare cellule, ma anche preservarne le caratteristiche principali quali morfologia, attività metabolica e capacità duplicative¹³. Lo schema costruttivo è simile a quello mostrato per le nanocapsule evitando la rimozione dello stampo, che questa volta è una cellula biologica.

Questa scoperta ci ha fatto immediatamente pensare alla possibilità di utilizzare cellule incapsulate come bio-fabbriche o bio-reattori eventualmente operanti in ambienti specifici o su bersagli specifici in funzione delle condizioni al contorno.^{13,18} La vitalità delle cellule di lievito incapsulate è stata studiata utilizzando il microscopio confocale e sonde fluorescenti specifiche per DNA e attività metabolica.

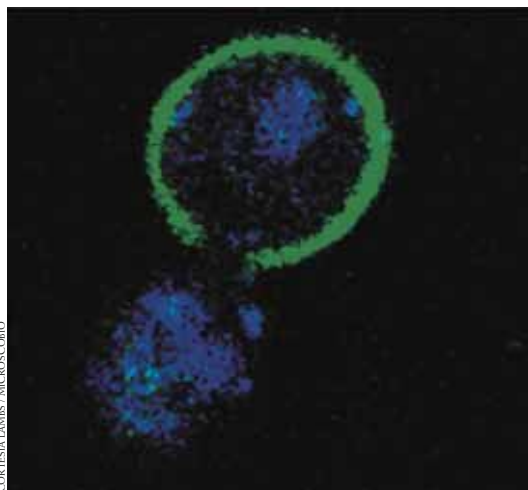


Figura 4. Cellula di lievito incapsulata che origina una figlia.

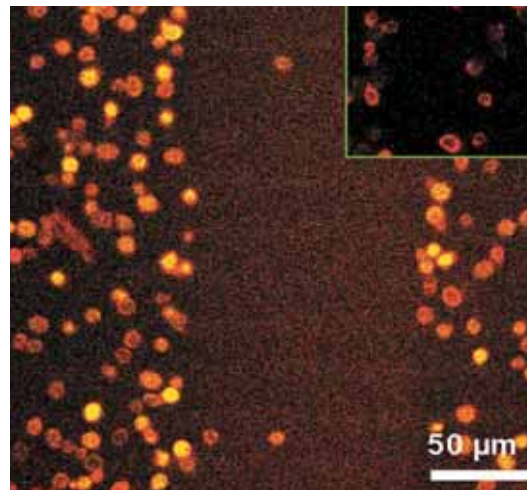


Figura 5. Nanobiorobot ordinati su superficie nanostrutturata.

In figura 3 è mostrata una popolazione di questi nanobiorobot mentre la figura 4 mostra come l'incapsulamento non prevenga la possibilità di duplicazione della cellula vivente. La capacità di mantenere condizioni vitali ci permette di progettare una serie di esperimenti in cui la cellula di lievito sia il produttore di sostanze biologiche a comando, sostanze che vengono trattenute in modo controllato dalla nanocapsula e rilasciate solo a determinate condizioni su bersagli specifici, che vengono riconosciuti tramite la funzionalizzazione del guscio della nanocapsula.

Dopo essere riusciti a indurre un'espressione proteica specifica, ad esempio di proteine fluorescenti verdi prodotte quando l'ambiente del nanobiorobot viene invaso da galattosio al posto di altri nutrienti, il sistema è stato inserito in un altro sistema biologico e collaudato nei confronti degli attacchi di enzimi lisosomiali, come le lipasi o le proteasi. Nel nostro caso si è avviata con successo la progettazione di nanocapsule resistenti agli attacchi biologici di un particolare ospite, l'organismo unicellulare *Paramecium primaurelia*.

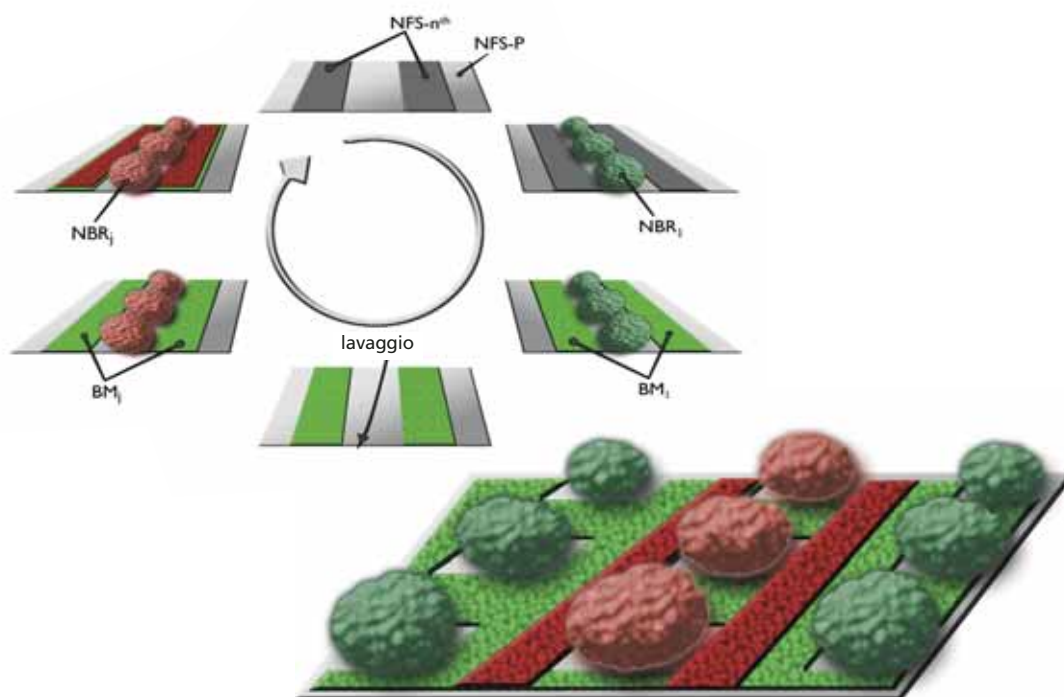
L'entrata dei nanobiorobot è veicolata da vacuoli alimentari. Oggi si stanno analizzando i comportamenti dei nanobiorobot e dell'organismo ospitante, dopo avere trovato il numero di strati ottimali e le condizioni saline di lavoro per evitare la duplicazione e mantenere attive le cellule di lievito incapsulate. Parallelamente è in corso una sperimentazione volta a ottimizzare il comportamento del nanobiorobot come produttore di proteine specifiche. Il nanobiorobot è dotato di una fabbrica proteica particolarmente efficiente nella programmazione di espressione proteica extracellulare, che utilizza *Pichia pastoris*, un ceppo di lievito che in biologia molecolare ha portato alla massiccia produzione di

proteine eterologhe. La produzione di proteine avviene con meccanismi di *fold*ing e modifiche post-traduzionali del tutto simili a quelle degli organismi superiori. In questo senso *Pichia pastoris* è un ottimo compromesso tra efficienza di produzione e prodotto finito, poiché fa sì che la proteina espressa abbia caratteristiche molto simili a quelle di una proteina prodotta da una cellula superiore. L'evoluzione del nanobiorobot si è poi sviluppata con *Saccharomyces cerevisiae*, ceppo che da tempo viene impiegato nei laboratori di biologia molecolare per raffinati e controllabili sistemi di espressioni proteiche, grazie al fatto che il suo intero genoma è stato sequenziato e tutti i suoi geni identificati.

In questo caso la difficoltà maggiore riguarderà l'inserzione di un vettore episomico o cromosomico che assicuri l'inducibilità dall'esterno dell'espressione proteica e una sequenza di estrusione della proteina che le permetta di essere rilasciata nell'ambiente extracellulare, in questo caso tra la cellula e le pareti della nanocapsula. In questo sistema è possibile produrre una qualsiasi proteina di mammifero con la possibilità di averne un'espressione nativa e geneticamente controllata. Con queste unità può essere realizzata una sorta di catena di montaggio robotizzata avvalendosi della possibilità di ancorare i nanobiorobot a superfici nanostrutturate che da un lato ne vincolino la posizione e dall'altro ne raccolgano il prodotto, ad esempio proteine naturalmente purificate.

Occorre realizzare i presupposti per cui l'auto-
ma operi in modo ripetitivo e ad alto livello di parallelismo in un ambiente nel quale ha a disposizione un vasto magazzino di materiali e l'energia necessaria per eseguire qualsiasi operazione su di essi.

I nanobiorobot sono stati quindi ordinati su una superficie vetrosa nella quale sono state poste per



CORTESIA LAMIS / MICROSCORBIO

Figura 6. La figura in alto a sinistra schematizza l'attività di una fabbrica impiegante nanobiorobot attraverso i diversi passaggi del ciclo produttivo: sulle piste vengono indirizzati i nanobiorobot (verdi) che producono una certa sostanza A, al termine della produzione vengono rimossi e rimpiazzati con altri (rossi) che producono una sostanza B (uguale o differente). Il processo viene iterato fino al conseguimento della struttura supramolecolare desiderata. Non solo l'uso di nanobiorobot rende flessibile la fabbrica, ma permette di realizzare reti molecolari organizzate spazialmente in modo ottimizzato come mostra, in basso a destra, un esempio di configurazione spaziale dei nanobiorobot nella fabbrica.

microcontatto piste a carica opposta, in grado di mantenere ancorate le nanocapsule contenenti le cellule di lievito²². Il successo di questa operazione di bloccaggio ha permesso di avviare la progettazione di superfici nanostrutturate, basate su stampa a microcontatto biocompatibile²³. In questo modo è possibile disporre sistemi proteici su substrati solidi²⁴, a loro volta in grado di interagire con sistemi biologici o altri sistemi proteici per formare complessi supramolecolari. Si tratta quindi di un innesto selettivo di molecole organiche su superfici varie, ad esempio vetrose o metalliche. Con questo tipo di metodica è possibile realizzare superfici ospitanti, autostrade proteiche o enzimatiche²⁴ e corsie a carica programmabile²².

In questo modo i nanobiorobot vengono sistemati sulle piste cariche delle superfici funzionalizzate e spinti, da condizioni esterne, a produrre proteine specifiche o altri bioprodotto nel modo deciso dalla modificazione genetica subita dalle cellule ospitate. Il prodotto viene raccolto sulle piste a base organica in base a una affinità biochimica programmabile. Terminato il loro compito i nanobiorobot

possono essere rilasciati e le locazioni che li ospitavano ripopolate da altri nanobiorobot specializzati nel produrre altre molecole che verranno accatastate sulle precedenti (figura 5,6). Si potranno così formare in modo estremamente flessibile strutture supramolecolari utilizzabili, ad esempio *stack* di proteine naturalmente purificate.

Lo scenario di Feynman

Il connubio tra le nanoscienze, che studiano le proprietà dei materiali alla scala più bassa a cui la natura opera, e le nanotecnologie, che riguardano la progettazione, caratterizzazione, costruzione e applicazione di nanostrutture e nanodispositivi, può portare a una nuova rivoluzione scientifica³. I nanobiorobot si presentano come un sistema versatile, che consente di controllare la materia al miliardesimo di metro, e dove il sinergismo costruttivo tra le nanotecnologie e le nanoscienze potrebbe aprire nuovi traguardi. Lo scenario intravisto da Richard Feynman oltre 40 anni fa si concretizza giorno dopo giorno. Con le nanocapsule, ad esempio, si aprono non solo nuove prospettive per la somministrazione

dei farmaci, per la cura dei tumori, per lo sviluppo di biosensori sentinella dell'ambiente e del corpo umano, ma anche nuove vie di collaborazione tra i polimeri e le cellule viventi. Infatti la nuova frontiera è una nanocapsula che non si limita a compiere un viaggio nel corpo umano, ma impara anche a eludere la sorveglianza immunitaria e giunta nelle vicinanze del tumore riesce a distruggerlo senza danneggiare i tessuti sani. Appena individua le cellule malate, le attacca con i farmaci che trasporta e che produce in continuazione.

L'obiettivo più avanzato è infatti collocare nella nanocapsula una cellula viva, non artificiale, che arrivata a destinazione sia capace di trasformarsi in nanobiorobot per fornire enzimi, proteine e sostanze attive, necessarie a ripristinare la salute del

paziente. Questa prospettiva va senz'altro presa con estrema cautela, ma ricordando comunque che la distanza tra la fantascienza e la realtà si è notevolmente accorciata negli ultimi decenni.

Alberto Diaspro, IFOM-LAMBS, Centro MicroScoBio, Dipartimento di Fisica, Università di Genova. IFOM, Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milano.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutte le ricercatrici e i ricercatori di LAMBS-MicroScoBio. Ad Alessandra Gliozzi un ringraziamento particolare, per aver portato il progetto Nanocapsule in Italia e per avermi coinvolto. Grazie a Paola Ramoino, Raffaella Magrassi, Silke Krol e Paolo Bianchini per protozoi, nanocapsule e scenari grafici.

Note

1. Isaac Asimov, *Visioni di Robot*, Net, il Saggiatore, n.181, 2005.
2. Le Tre Leggi Fondamentali della Robotica: 1) un robot non può recar danno agli esseri umani né può permettere che, a causa del suo mancato intervento, gli esseri umani ricevano danno, 2) un robot deve obbedire agli ordini impartiti dagli esseri umani tranne nel caso che tali ordini siano in contrasto con la Prima Legge; 3) un robot deve salvaguardare la propria esistenza purché ciò non sia in contrasto con la Prima o la Seconda Legge. (Le tre leggi furono formulate da Asimov con l'aiuto del suo editore John F. Campbell, perché stanco di leggere storie in cui i robot, come Frankenstein, si ribellavano al proprio creatore diventando mostri terrificanti. Il tutto a seguito di una conversazione fatta il 23 dicembre 1940 riguardante il racconto di Ray Cummings, X-1-2-200, apparso su *Astounding* del settembre 1938).
3. Salvatore Cannistraro, Nanoscienze e nanotecnologie: una sfida ed una opportunità per la ricerca italiana nel contesto europeo. *Analysis*, 4, 1-5, 2004.
4. K.Eric Drexler, Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation, *Pnas*, Vol. 78, No. 9;5275-5278 (1981)
5. Richard P. Feynman, Il piacere di scoprire, Biblioteca Scientifica Adelphi, n.43, 127-148, 2002. (si veda anche <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>)
6. K. Eric Drexler, Nanotechnology: From Feynman to Funding. *Bulletin of Science, Technology & Society*, Vol. 24, No. 1, 21-27 (2004).
7. Vincenzo Tagliascio, *Dizionario degli esseri umani fantastici e artificiali*, Oscar Saggi, Mondadori, 1999.
8. K., Benenson et al. Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. *Nature* Vol. 414; 430-434 (2001).
9. C. Mavroidis, A.Dubey, M.L. Yarmush. Molecular machines. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, vol.6;363-395 (2004).
10. W.B.Sherman, N.C.Seeman. A Precisely controlled DNA biped walking device. *Nano Lett.* vol.4(7), 1203-1207 (2004).
11. Vincenzo Balzani e Margherita Venturi, Dispositivi e mac-

- chine molecolari, in *Storia della Scienza*, Istituto della Enciclopedia Italiana G. Treccani, vol.IX, 393-404, 2003.
12. A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi. Costruire cellule artificiali, *Le Scienze*, 419, pp.68-73, (2003).
13. A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi A. Single Living Cell Encapsulation in Nano-Organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir*. Vol. 18, 5047-5050, 2002.
14. G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites, *Science*, Vol. 277;1232-1237 (1997).
15. H. Möhwald, From Langmuir monolayers to Nanocapsules, *Coll. Surf. A*, 171; 25-35 (2000).
16. A. Diaspro, Nanocapsules: A European Community Interdisciplinary Network in the Nanobiosciences. *IEEE Transactions On Nanobioscience*. vol. 3(1) pp. 1-2 (2004).
- A. Diaspro, S. Krol, O. Cavalleri, D. Silvano A. Gliozzi, Microscopical Characterization of Nanocapsules Templated on Ionic Crystals And Biological Cells Toward Biomedical Applications. *IEEE Transactions On Nanobioscience*. Vol. 1(3) Pp. 110-115, 2002.
17. P. Soon-Shiong, Treatment of type 1 diabetes using encapsulated islets, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 35; 259-270 (1999).
18. Ai H, Jones SA, Lvov YM., Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys*. 39(1):23-43 (2003).
19. Haisch A. et al., Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation, *Biomaterials*, 21;1561-1566 (2000).
20. Li R. H., Materials for immunoisolated cell transplantation *Advanced Drug Delivery Reviews* 33, pp. 87-109, 1998.
21. A. Diaspro, Il radioso futuro della microscopia ottica, *Darwin*, 3, 44-49, 2004.
22. Krol S. et al., Encapsulated Living Cells On Microstructured Surfaces. *Langmuir*. Vol. 21;705-709 (2005)
23. A. Bernard et al., Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14, 2225-2229, 1998.
24. N. Sgarbi et al., Self-assembled extracellular matrix protein networks by microcontact printing, *Biomaterials* 25, 1349-1353 (2004).