



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRENTO

Dipartimento di Ingegneria e Scienza dell'Informazione

Corso di Laurea in
Informatica

ELABORATO FINALE

TITOLO

Sottotitolo (alcune volte lungo - opzionale)

Supervisore
Martin Michael Hanczyc

Laureando
Carlotta Porcelli

Anno accademico 2015/2016

Ringraziamenti

qualcosa

Indice

Sommario	2
1 Introduzione	3
1.1 La Biologia Sintetica	3
1.2 Il progetto EVOBLISS	4
1.2.1 EVOBLISS a Trento	4
2 La piattaforma robot	5
2.1 La componente hardware	5
2.1.1 La testa	7
2.1.2 Le siringhe	7
2.2 La componente software	8
2.2.1 Il controllo manuale	8
2.2.2 La calibrazione	8
2.2.3 L'identificazione delle <i>droplets</i>	8
3 Il sistema chimico	9
3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi	9
3.1.1 L'importanza del movimento	9
3.2 Componenti inorganiche	10
4 Final Multi Tracker	11
4.1 Image processing	11
4.1.1 droplet detection	11
4.2 csv	11
5 Conclusioni e Sviluppi Futuri	12
5.1 Cras in aliquam quam, et	12
5.1.1 Sed pulvinar placerat enim, a	12
5.2 Vivamus hendrerit imperdiet ex. Vivamus	12
Bibliografia	12
A Titolo primo allegato	14
A.1 Titolo	14
A.1.1 Sottotitolo	14
B Titolo secondo allegato	15
B.1 Titolo	15
B.1.1 Sottotitolo	15

Sommario

“The Three Laws of Robotics:

- 1: A robot may not injure a human being or, through inaction, allow a human being to come to harm;
- 2: A robot must obey the orders given it by human beings except where such orders would conflict with the First Law;
- 3: A robot must protect its own existence as long as such protection does not conflict with the First or Second Law;

The Zeroth Law: A robot may not harm humanity, or, by inaction, allow humanity to come to harm.”

Sommario è un breve riassunto del lavoro svolto dove si descrive l’obiettivo, l’oggetto della tesi, le metodologie e le tecniche usate, i dati elaborati e la spiegazione delle conclusioni alle quali siete arrivati.

Il sommario dell’elaborato consiste al massimo di 3 pagine e deve contenere le seguenti informazioni:

- contesto e motivazioni
- breve riassunto del problema affrontato
- tecniche utilizzate e/o sviluppate
- risultati raggiunti, sottolineando il contributo personale del laureando/a

1 Introduzione

“Why is it less acceptable to seek how to make a cell than how to make a molecule?”

— Stéphane Leduc

”Come è iniziata la vita?”: la domanda più interessante che l’umanità si sia mai posta. La necessità di trovare una spiegazione al fenomeno dell’origine della vita ha portato il mondo della ricerca a soffermarsi sulla possibile riproducibilità in laboratorio di aspetti semplici degli organismi viventi. Nel 1911 Stéphane Leduc, biologo francese, scrisse: «[...] la sintesi della vita deve avvenire nella produzione di forme intermedie tra il mondo organico ed il mondo inorganico, forme che possiedono soltanto alcuni rudimentali attributi di vita, alle quali altri attributi verranno aggiunti nel corso dello sviluppo dall’azione dell’ambiente circostante». Questa unione di elementi provenienti dal mondo vivente e dal mondo ”non vivente” ci permette di iniziare la costruzione di strutture semplici per poi svilupparle in forme sempre più simili ad ”esseri viventi”. Lo studio affrontato in questo progetto si avvale delle tecniche della biologia sintetica per tentare di riprodurre comportamenti molto semplici, il movimento nel nostro caso.

1.1 La Biologia Sintetica

Nel 1912 appare per la prima volta il termine ”biologia sintetica” coniato dal biologo francese Stéphane Leduc (1853-1939) nel libro ”La Biologie Syntetique”. Egli affermò: «Quando avremo modo di conoscere il meccanismo fisico della produzione di un oggetto o di un fenomeno,[...] diventa possibile[...] riprodurre l’oggetto o il fenomeno, in quel momento la scienza diventa sintetica. La biologia è una scienza come le altre, [...] deve essere in successione: descrittiva, analitica e sintetica». Lo scopo del nostro progetto è quello di riprodurre caratteristiche base degli organismi viventi, nello specifico ci si è soffermati sul movimento in un sistema chimico.

Il termine viene successivamente ripreso nel 1974 dal genetista polacco Waclaw Szybalski: «Discutiamo ora del seguente problema, ovvero cosa avverrà dopo? Fino ad ora abbiamo lavorato sulla fase descrittiva della biologia molecolare. Ma la vera sfida partirà quando entreremo nella fase della sintesi biologica[...]. Io non credo che esauriremo idee nuove ed eccitanti[...] nella biologia sintetica.» [10]

Al fine di ”sintetizzare” un essere vivente, le caratteristiche da ricercare sono:

- un corpo: per distinguere il soggetto dall’ambiente circostante
- un metabolismo: processo per il quale il soggetto prende risorse dall’ambiente e le trasforma in sostanze di mantenimento
- informazione ereditabile: contenuta nel genoma ed in grado di essere passata alle generazioni successive

L’unione dei primi due punti ci porta ad avere un organismo in grado di muoversi e replicarsi, se in seguito aggiungessimo la capacità di passare l’informazione genomica avremmo così realizzato un soggetto evolutivo. La Biologia Sintetica prevede due approcci diversi, nel primo caso si cerca di ricreare una nuova funzione e applicazione riprogrammando organismi già esistenti. Il secondo approccio prevede la sintesi da zero di forme di vita artificiale con alcune funzionalità degli esseri viventi aggiungendo singoli componenti al sistema. Il progetto si è focalizzato su questo approccio. Varie sostanze chimiche vengono utilizzate e riorganizzate in strutture e reti che si comportano come sistemi viventi. I sistemi vengono alimentati con opportuni nutrienti e viene osservato il loro comportamento, nello specifico il movimento, altra caratteristica fondamentale di un organismo vivente.

1.2 Il progetto EVOBLISS

Il progetto EVOBLISS è un progetto di ricerca europeo finanziato dalla Commissione Europea FET (Future and Emerging Technologies). A questo progetto partecipano i laboratori di cinque diverse università europee:

- IT University of Copenhagen (ITU) – Denmark
- University of West of England (UWE) – Bristol, Great Britain
- Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – Germany
- University of Glasgow (UGL) – Great Britain
- Università degli Studi di Trento – Italy

Il progetto mira a sviluppare un tipo di evoluzione artificiale e tecnologica da utilizzare per la progettazione di sistemi funzionali composti da tre forme di *living technology*: vita chimica artificiale, microrganismi viventi e da reti di reazioni chimiche complesse usate per migliorare il processamento e la purificazione di acque di scarico per la generazione di energia. Il progetto EVOBLISS combina gli approcci scientifici della robotica, dell'intelligenza artificiale, della chimica e della microbiologia per sfruttare al meglio le avanguardie di queste discipline. Lo scopo finale è quello di produrre una piattaforma robotica facilmente utilizzabile e personalizzabile per l'evoluzione artificiale di nuovi materiali e per l'ottimizzazione delle performance di sistemi psicochimici e microbici. Il prodotto su cui si è lavorato è EvoBot, un robot in grado di gestire liquidi e di fornire riscontri in tempo reale, sui sistemi da esso stesso creati.

1.2.1 EVOBLISS a Trento

Il laboratorio di Biologia Artificiale del CIBIO - Centre for Integrative Biology dell'Università di Trento è parte integrante del progetto EVOBLISS. Qui ci si occupa di sviluppare diversi tipi di cellule artificiali basandosi su emulsioni *droplet-based*. Le *droplets* a cui si fa riferimento sono composte da *1-Decanolo* ($C_{10}H_{21}OH$). Il decanolo è formato da una catena lineare di alcol grasso con 10 atomi di carbonio.[1] Essendo incolore vi si aggiunge *Oil Red O* [2], un colorante solubile con i grassi che lo rende visibile all'occhio umano e ci permette di tenerne traccia all'interno del sistema. Le *droplets* analizzate hanno volume pari a $30\mu l$, il volume è stato scelto per avere una migliore tracciabilità dal programma di analisi di *computer vision*. Le caratteristiche prese in analisi sono simili a quelle che possono caratterizzare un essere vivente: l'auto-movimento, l'auto-divisione, la trasformazione biochimica e le dinamiche di gruppo.

La piattaforma è stata qui adattata alla necessità di monitorare il movimento delle *droplets* a partire dal momento in cui queste escono da un sistema di equilibrio, studiando l'ottimizzazione dei parametri che definiscono l'ambiente in cui queste si muovono. Lo scopo ultimo è quello di incrementare la conoscenza delle *living technologies* e di ideare e sfruttare al meglio sistemi bio-ibridi innovativi. Ulteriori studi hanno visto l'implementazione di programmi per il riconoscimento di droplets multiple.

2 La piattaforma robot

EvoBot è un robot che unisce elementi delle stampanti 3D con quelli della robotica modulare per fornire a chimici, microbiologi e ricercatori nel campo della vita (a livello chimico) artificiale, uno strumento economico ed estendibile basato su una piattaforma open source di robotica per il trattamento di liquidi. La particolarità di EvoBot sta nell'interazione continua ed in tempo reale dell'utente con l'esperimento in corso.[5] Inoltre utilizzare un robot per la gestione degli esperimenti ci ha permesso di diminuire, quasi annullare, l'incertezza e la variazione tra gli esperimenti causata dalla mano umana. Come le comuni stampanti 3D, questo robot è composto da una componente hardware guidata da una parte software.

2.1 La componente hardware

EvoBot è composto, a livello elettronico, da un Arduino Mega 2560 su cui è montata una scheda RAMPS (RepRap Arduino Mega Pololu Shield); queste due schede controllano la testa del robot, i moduli ad essa collegati e gli input provenienti da sensori esterni. A livello meccanico, invece, è strutturato in tre strati: *actuation layer*, *experimental layer* e *observation layer*.

Partendo dal basso si trova lo strato dell'osservazione: *observation layer*. Questo *layer* non prevede nessuna interazione con gli esperimenti in corso sul layer superiore. E' utilizzato per il posizionamento di moduli che andranno a raccogliere dati, senza manipolare direttamente l'esperimento, che verranno forniti sia al robot sia all'utente. Nel nostro caso è presente una webcam.

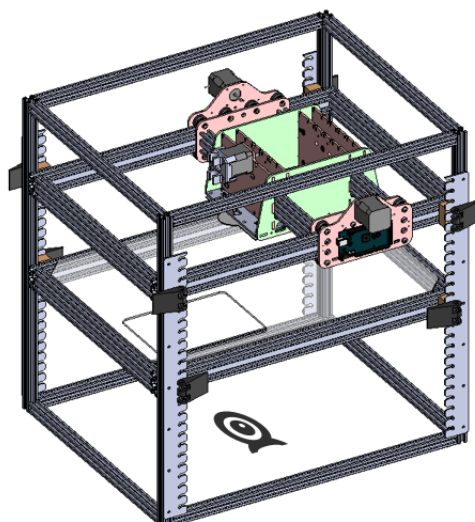


Figura 2.1: La struttura completa con l'observational layer

Il secondo strato è quello degli esperimenti: *experimental layer*. Questo strato è essenzialmente composto da una cornice in alluminio, identica a quella della struttura esterna del robot, che racchiude una piastra di vetro. Su questo strato possono essere posti i recipienti richiesti dagli specifici esperimenti. Una fessura rettangolare ad uno degli angoli permette le manovre di sostituzione dei recipienti in uso. La sua funzionalità verrà sfruttata in futuro creando un distributore automatico di *Petri dish* da posizionarvi all'interno.

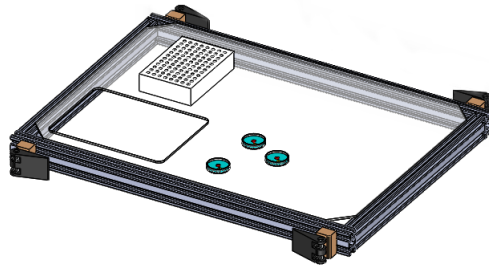


Figura 2.2: experimental layer

L'ultimo dei tre strati è lo strato di attivazione, *actuation layer*, ovvero la testa del robot. Questo layer si occupa del movimento della testa sul piano orizzontale per mezzo di un meccanismo cinghia-ruota dentata con due motori *stepper*. La testa si può muovere nelle due direzioni sul livello orizzontale: x e z .

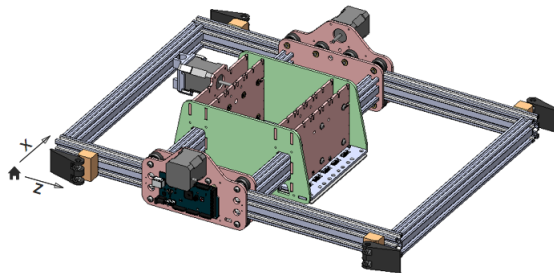


Figura 2.3: actuation layer

2.1.1 La testa

La *head*, testa del robot, è la componente principale dell'*actuation layer*. E' composta di 17 *socket* all'interno delle quali possono essere inseriti diversi moduli. Tuttavia, per come è stata strutturata, non c'è possibilità di inserire tutti i moduli contemporaneamente. Essa può contenere fino ad un massimo di 11 moduli per fornire funzionalità differenti. Ad oggi esiste soltanto il modulo siringa ma si prevede nel breve futuro, la costruzione di altri moduli come sensori di pH e di temperatura.

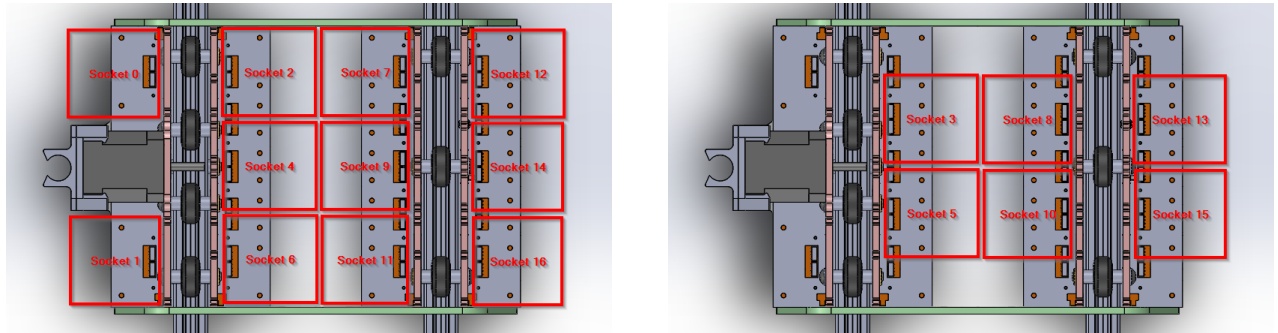


Figura 2.4: socket disposition

2.1.2 Le siringhe

Il modulo siringa ha due gradi di movimento verticale. Ogni modulo è composto di un motore passo-passo lineare per il movimento dello stantuffo, *plunger*, e di un meccanismo a rocchetto e cremagliera con un secondo motore passo-passo per il movimento del corpo della siringa. La siringa può essere facilmente sostituita dando all'utente l'opportunità di utilizzare siringhe con specifiche differenti in base alle necessità dell'esperimento. Le siringhe sono la componente di EvoBot che gli consente di gestire sostanze liquide.

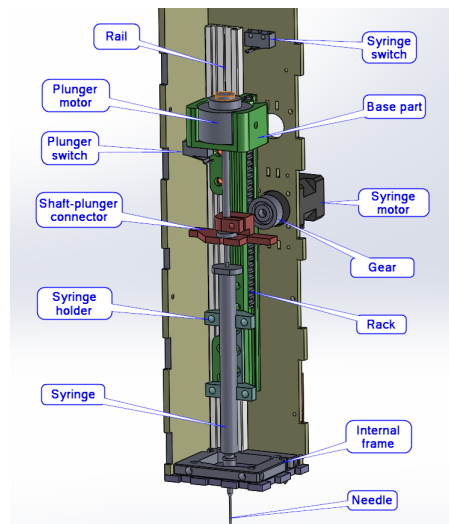


Figura 2.5: syringe module

2.2 La componente software

La finalità della componente software è quella di fornire all'utente finale un'interfaccia facilmente programmabile per guidare il robot. Il software è suddiviso in una *host side* e in una *robot side*. La prima comunica con la seconda attraverso una connessione USB. La *robot side* è una versione modificata del firmware Marlin usato nei programmi opensource delle stampanti 3D.

Il linguaggio di programmazione utilizzato per la stesura delle API e dei programmi successivi è Python. La suite software offerta al momento dell'installazione è composta da tre elementi: un programma di *computer vision* per la calibrazione del robot, un'interfaccia grafica per il controllo manuale del robot ed un esempio di programma, sviluppato utilizzando le API, per l'identificazione delle componenti di uno specifico esperimento.

L'obiettivo dello sviluppo della componente software è stato quello di creare un programma in grado di controllare il robot manualmente in tempo reale e raccogliere i dati necessari dagli esperimenti eseguiti, di cui si parlerà nel prossimo capitolo.

2.2.1 Il controllo manuale

La scelta di un software per il controllo manuale del robot nasce dalla necessità di ottenere la posizione di oggetti di interesse (Petri dishes e recipienti vari) sullo strato degli esperimenti. L'interfaccia grafica permette di testare le diverse funzioni del robot senza il bisogno di ricorrere alla programmazione. Per esempio, si può muovere la testa del robot fino a centrare uno dei contenitori, far scendere la siringa all'interno di questo e registrare la posizione del centroide dell'oggetto.

Per controllare manualmente EvoBot si utilizza Printron [4], una *3D printing host suite* opensource, con la quale, attraverso dei codici G standard, si controlla il movimento della testa del robot e con dei codici M speciali si controlla il movimento delle siringhe e degli stantuffi. Inoltre con i codici M si possono identificare i limiti dei due movimenti che una siringa può compiere.

2.2.2 La calibrazione

La calibrazione è il primo passo importante per correlare il sistema di coordinate della videocamera con quello del robot. A questo scopo viene creata la matrice di trasformazione compiendo le istruzioni imposte dal programma `calibrationExample.py`. Avendo la possibilità di posizionare le differenti piastre di Petri su tutto lo strato degli esperimenti o di impostare la distanza tra *l'actuation layer* e *experimental layer*, il programma è pensato per specificare i punti esatti per una massima accuratezza nella calibrazione. All'interno del programma si definisce il punto in cui è posizionata la Petri *dish*, il suo diametro e la distanza tra i due layer. Avvenuta la calibrazione, si hanno a disposizione le matrici di ogni siringa da poter utilizzare nei programmi successivi per muovere le siringhe nei punti richiesti dagli esperimenti.

2.2.3 L'identificazione delle *droplets*

Una delle finalità prioritarie del progetto è l'identificazione di gocce, *droplets*, per trovare l'area, il colore, il numero, la forma e, più importante, per tracciarne il movimento.

La componente principale utilizzata per l'identificazione è la libreria OpenCV (Open Source Computer Vision Library)[3] che include diverse funzioni ed algoritmi di *computer vision*.

3 Il sistema chimico

Una delle proprietà fondamentali degli organismi viventi è l'abilità di sentire e rispondere ai cambiamenti dell'ambiente tramite il movimento. Se consideriamo la cellula, in termini generali, come un sistema chimico aperto in una situazione di non-equilibrio, è essenziale avere a disposizione un rifornimento di materiale fresco e di energia per sostenere questo sistema. Per fare in modo che questo avvenga, la cellula modifica il suo ambiente esterno metabolizzando risorse di sostentamento e producendo dei prodotti e degli scarti. Per evitare una situazione statica, di equilibrio, il sistema deve trovare in qualche modo nuove risorse da sfruttare e allo stesso tempo deve evitare gli eventuali effetti inibitori dei prodotti di scarto. In questo senso puramente chimico-biologico si crede che l'abilità di movimento giochi un ruolo importante per evitare lo stato di equilibrio nella creazione di sistemi cellulari artificiali. [8]

3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi

Una cellula che percepisce delle molecole solubili può muoversi lungo il gradiente di concentrazione creato da queste fino a raggiungere la sorgente oppure allontanarsi da questa nel caso in cui le sostanze rilasciate siano repellenti o tossine. In generale, la motilità di una cellula può essere di tre tipi:

1. motilità basale casuale: avviene in assenza di stimoli chimici,
2. Chemiochinesi: corrisponde ad un movimento casuale crescente, in risposta a stimoli chimici,
3. Chemiotassi: migrazione stimolata direzionale verso un gradiente chimico.

La *chemiotassi* può essere di tipo positivo in caso di avvicinamento alla sorgente e di tipo negativo in caso di allontanamento.

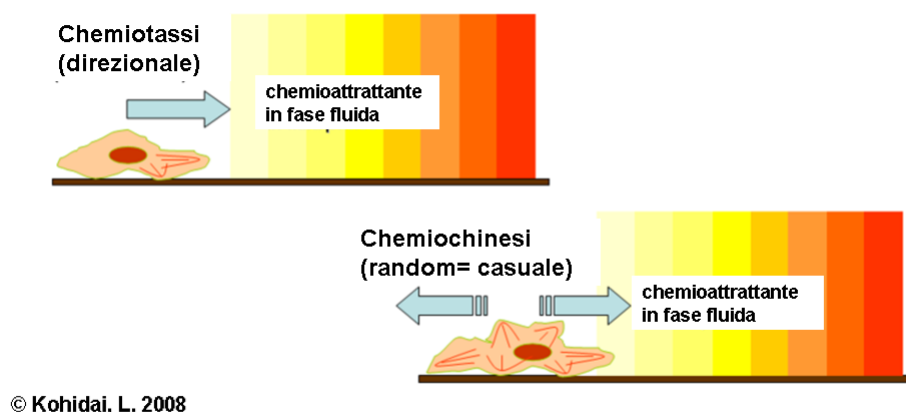


Figura 3.1: chemiotassi e chemiochinesi

In questo studio ci si sofferma sul movimento chemiotattico positivo promosso da una *droplet* di decanolo in acido decanoico lungo il gradiente di concentrazione creato dall'aggiunta di cloruro di sodio.

3.1.1 L'importanza del movimento

Per gli organismi multicellulari la chemiotassi è importante nei processi fisiologici, come il reclutamento di cellule del sistema immunitario nei siti dell'infezione e negli organi dello sviluppo durante

l'embriogenesi.[6] Le cellule neuronali e quelle embrionali, invece, migrano durante lo sviluppo. Durante l'angiogenesi, le cellule endoteliali vanno incontro a chemiotassi per formare i vasi sanguigni, mentre le cellule epiteliali e i fibroblasti si muovono con chemiotassi durante la guarigione di una ferita.[7] Tuttavia, oltre al ruolo in processi ovviamente benefici, la chemiotassi è coinvolta anche in tutti gli stadi cruciali del tumore cellulare, dalla disseminazione alla progressione delle metastasi. Molte cellule cancerogene, nello specifico quelle del tumore al seno, sono note per avere la preferenza nel metastatizzarsi in specifici organi e tessuti. Questa preferenza è correlata alla produzione di chemioattraenti del tessuto e degli organi bersaglio e ad una sovrapproduzione dei recettori di queste sostanze sulla superficie delle cellule cancerose. [9]

3.2 Componenti inorganiche

Il sistema chimico studiato durante il progetto è composto da una *droplet* di decanolo che si muove in una soluzione acquosa di acido decanoico ($C_{10}H_{20}O_2$) lungo i gradienti di concentrazione formati con l'aggiunta di cloruro di sodio ($NaCl$).

4 Final Multi Tracker

dire qualcosa

4.1 Image processing

Si utilizza un set predefinito di colori per aiutare l'utente a scegliere la *droplet* desiderata. In caso di colori non convenzionali, dovuti a condizioni di luce senza limitazioni e con svariate variazioni, l'utente può trovare ed impostare i parametri HSV, Hue Saturation Value (tonalità, saturazione e valore), sulla schermata di dialogo con la camera. L'utente ha anche la possibilità di interagire con EvoBot muovendone la testa, il corpo delle siringhe e gli stantuffi. Questa funzionalità permette di tracciare ogni tipo di colore. Per fare in modo che la tracciabilità sia più stabile possibile, si può impostare un'area specifica, centrando per esempio il centro della Petri dish e regolando il diametro così da coprirne l'intera superficie. In questo modo l'ambiente circostante viene escluso dall'applicazione dei filtri per il riconoscimento dei colori da ricercare. Negli esperimenti condotti si è utilizzata una singola *droplet* di colore rosso.

4.1.1 droplet detection

- nutrimento di cellule singole e sopravvivenza +
- condizioni di malattia e di salute
- trasporto di cargo

4.2 csv

5 Conclusioni e Sviluppi Futuri

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

5.1 Cras in aliquam quam, et

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

5.1.1 Sed pulvinar placerat enim, a

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

5.2 Vivamus hendrerit imperdiet ex. Vivamus

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

Bibliografia

- [1] Decanolo. <https://en.wikipedia.org/wiki/1-Decanol>. ultimo accesso 27/02/2016.
- [2] Oil red o. https://en.wikipedia.org/wiki/Oil_Red_O. ultimo accesso 27/02/2016.
- [3] Opencv. <http://opencv.org/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [4] Pronterface. <http://www.pronterface.com/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [5] robotic platform. <https://blogit.itu.dk/evoblissproject/overview/progress/evolutionary-robotic-platform/>. ultimo accesso 18/02/2016.
- [6] Kurt S. Zänker Frank Entschladen. *Cellmigration: signalling and mechanisms*. Karger, 2009.
- [7] Paul Martin. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309):75–81, 1997.
- [8] † Martin M. Hanczyc, ‡ Taro Toyota, ‡ Takashi Ikegami, † Norman Packard, , and ‡ Tadashi Sugawara*. Fatty acid chemistry at the oil–water interface: self-propelled oil droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(30):9386–9391, 2007. PMID: 17616129.
- [9] Evanthia T. Roussos, John S. Condeelis, and Antonia Patsialou. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8):573–587, 08 2011.
- [10] Wacław Szybalski. *In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription*. New York: Plenum Press, 1974.

Allegato A Titolo primo allegato

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

A.1 Titolo

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

A.1.1 Sottotitolo

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

Allegato B Titolo secondo allegato

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

B.1 Titolo

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.

B.1.1 Sottotitolo

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec sed nunc orci. Aliquam nec nisl vitae sapien pulvinar dictum quis non urna. Suspendisse at dui a erat aliquam vestibulum. Quisque ultrices pellentesque pellentesque. Pellentesque egestas quam sed blandit tempus. Sed congue nec risus posuere euismod. Maecenas ut lacus id mauris sagittis egestas a eu dui. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque at ultrices tellus. Ut eu purus eget sem iaculis ultricies sed non lorem. Curabitur gravida dui eget ex vestibulum venenatis. Phasellus gravida tellus velit, non eleifend justo lobortis eget.