
ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

INGEGNERIZZAZIONE DI MODELLI TRIDIMENSIONALI
DI METASTASI OSSEA

Elaborato in
Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici LM

Relatore:
Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da:
Lorenza Pia Atturio

Correlatore:
Dott. Joseph Lovecchio

Sessione II

Anno Accademico 2018/2019

*“Alla Determinazione,
Al Coraggio,
Alla Resilienza,
Che ti contraddistinguono”*

INDICE

Abstract	5
CAPITOLO 1	6
1.1 CENNI DI ANATOMIA DELLA MAMMELLA.....	6
1.2 CARCINOMA MAMMARIO.....	9
1.3 TESSUTO OSSEO.....	13
1.4 PANORAMICA DEL TESSUTO OSSEO METASTATICO.....	17
CAPITOLO 2: OBIETTIVI	23
CAPITOLO 3: MODELLO IN VITRO PER METASTASI OSSEE	25
3.1 COLTURA CELLULARE 2D VS 3D.....	25
3.2 MODELLI BIDIMENSIONALI.....	28
3.3 MODELLI TRIDIMENSIONALI.....	31
CAPITOLO 4: COLTURA CELLULARE DINAMICA	46
4.1 INTRODUZIONE.....	46
4.2 EFFETTO DELLA COLTURA DINAMICA SU MODELLI TUMORALI.....	49
Conclusioni	61
Bibliografia	63

Abstract

Nel 2018 in Italia sono stati diagnosticati 52300 nuovi casi di cancro al seno, pari al 14% dei tumori maligni totali e al 30% di quelli riguardanti il solo sesso femminile. La maggior parte dei casi di decesso derivano dall'insorgenza di metastasi ossee. Nell'ambito della ricerca oncologica gli approcci "tradizionali" prevedono l'utilizzo di modelli 2D, i quali semplificano drasticamente il contesto biologico di un tumore. Gli approcci 3D superano i limiti delle colture 2D, ricreando un modello del microambiente tumorale più appropriato. In queste strutture, le cellule tumorali tendono a crescere meglio, imitano le proprietà topografiche e meccaniche del tumore, adottando una forma sferoidale e generano dei cluster così come avviene *in vivo*. Ne consegue un ambiente di studio verosimile a quello naturale e quindi una più accurata valutazione del processo: aumentano le interazioni cellulari, mentre il modulo elastico e l'architettura del substrato influenzano la mecano-trasduzione e il suo impatto sulla neoplasia. Rimangono tuttavia alcuni ostacoli da superare, come l'assenza dell'interfaccia tessuto-tessuto, degli stimoli biomeccanici, della distribuzione spazio-temporale di ossigeno, nutrienti e rifiuti metabolici, normalmente presenti *in vivo*. A tale proposito, negli ultimi decenni sono stati introdotti sistemi di coltura dinamica, chiamati bioreattori. Questi dispositivi consentono di ricreare *in vitro* condizioni di coltura che riproducono il microambiente fisiopatologico presente *in vivo*, rispecchiando l'intera dinamica sottostante all'evoluzione metastatica. Quanto descritto, permette quindi di accelerare la ricerca oncologica al fine di ottenere terapie farmacologiche sempre più efficaci ed efficienti.

Capitolo 1

Nel 2018 in Italia sono stati diagnosticati 52300 nuovi casi di cancro al seno, pari al 14% di tutti i tumori maligni incidenti totali e al 30% nel solo sesso femminile.

Il rischio di sviluppare questa neoplasia, nell'arco della vita media, è estremamente alto: riguarda infatti 1 donna su 8.

L'utilizzo di modelli tissutali ingegnerizzati ha un ruolo d'interesse per lo studio di nuovi protocolli clinici e terapie specifiche per ogni singolo paziente.

Questo lavoro di tesi ha l'obiettivo di analizzare i progressi che l'ingegneria dei tessuti ha portato nello studio delle metastasi ossee da cancro alla mammella.

1.1 CENNI DI ANATOMIA DELLA MAMMELLA

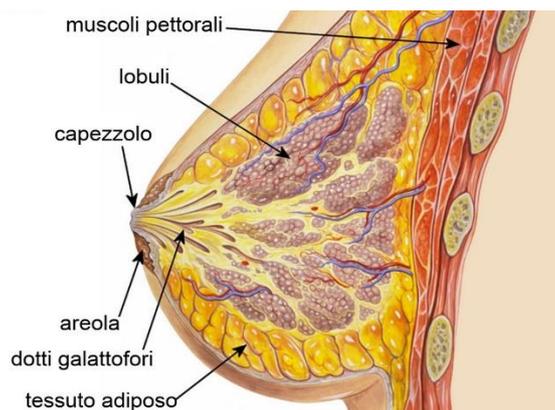


Figura 1.1: *Anatomia del seno*

La ghiandola mammaria è contenuta in uno sdoppiamento della fascia toracica superficiale, tra il foglietto anteriore e il foglietto profondo, che poggia sul muscolo grande pettorale e situata tra la seconda e sesta costa. E' costituita da circa venti lobi ghiandolari, convergenti nei dotti galattofori principali, che si dilatano a formare i seni lattiferi prima di raggiungere il capezzolo. La regione mammaria, dalla superficie alla profondità, appare costituita da una serie di strati sovrapposti:

1. cute;
2. tessuto connettivo sottocutaneo;

3. ghiandola mammaria;
4. strato cellulo-adiposo, che separa la ghiandola dalla fascia del muscolo grande pettorale, (strato cellulo-adiposo retromammario).

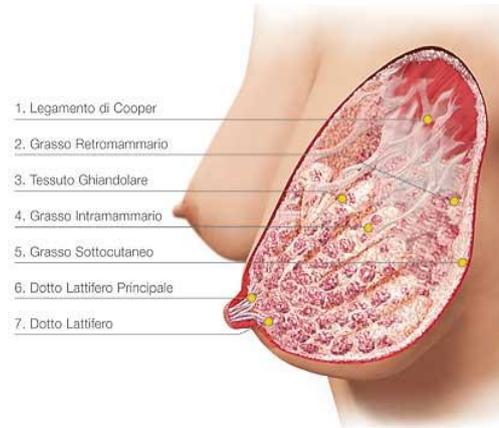


Figura 1.2: *Visione laterale dell'anatomia della mammella*

Il tessuto cellulo-adiposo sottocutaneo a livello della ghiandola si sdoppia in due foglietti: uno anteriore ed un altro posteriore. Quest'ultimo si collega alla fascia anteriore del gran pettorale ed al margine anteriore della clavicola mediante del tessuto connettivo più o meno lasso che rappresenta una sorta di legamento sospensore della mammella [Anastasi et al.,2012].

La ghiandola mammaria è una ghiandola esocrina, ovvero a secrezione esterna, formata da un'architettura complessa simile ad acini che producono latte sotto il controllo dell'ormone prolattina. Tale struttura è connessa ad una rete di dotti galattofori, il cui compito è incanalare le secrezioni verso il capezzolo. La cute della parte centrale presenta un'area circolare pigmentata e ricca di voluminose ghiandole sebacee, detta areola, dal cui centro sporge più o meno il rilievo del capezzolo.

Dal punto di vista istologico la ghiandola mammaria è composta da un insieme di dotti ed acini immersi in un tessuto stromale. La struttura ghiandolare, nel complesso, si presenta come un "albero in fiore" con i dotti galattofori maggiori che dal capezzolo si ramificano in strutture duttali minori fino ai duttuli delle così dette "unità terminali duttulo-lobulari" (TDLU, acronimo di Terminal Ductal-Lobular Unit). La TDLU è costituita da: acini, dotto collettore intra-lobulare e stroma intra-lobulare specializzato.

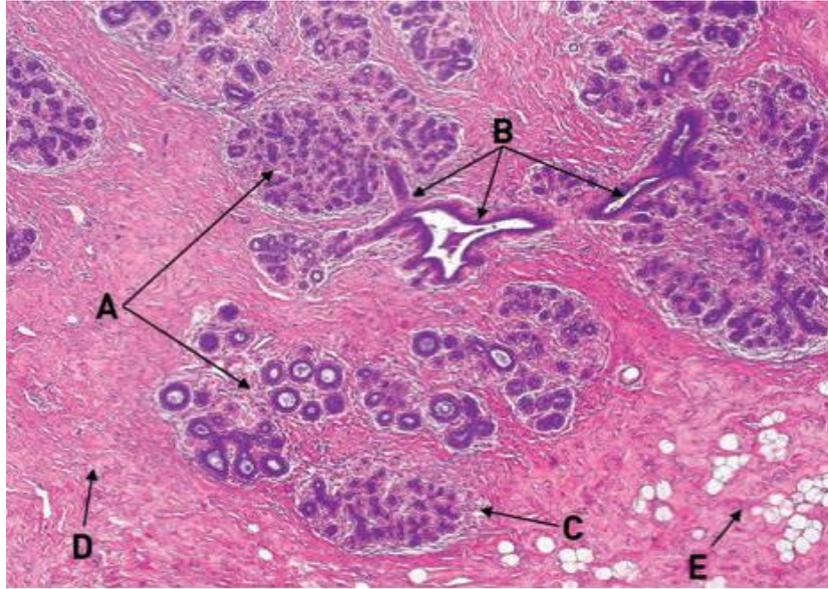


Figura 1.3: *Anatomia microscopica della mammella, architettura normale delle TDLU. Si osservano i lobuli(A), i dotti terminali con le loro principali diramazioni(B), lo stroma intra-lobulare specializzato(C), stroma aspecifico extralobulare(D), tessuto adiposo(E).*

1.2 CARCINOMA MAMMARIO

Il carcinoma mammario è una delle forme tumorali più diffuse, in Italia colpisce una donna su 9, e si contraddistingue per il suo elevato potenziale metastatico durante la sua evoluzione. Consiste nella moltiplicazione incontrollata di un tessuto ricco di cellule anomale all'interno della ghiandola mammaria. Il tumore al seno, quindi, origina dalle cellule epiteliali dell'albero ghiandolare e può dare origine a diversi isotipi.

La TDLU, oltre ad essere l'unità funzionale della ghiandola mammaria, rappresenta la sede da cui origina la maggior parte dei carcinomi. Successivamente, per meccanismi non del tutto noti, permette lo sviluppo di tumori diversi sia dal punto morfologico che per il comportamento biologico (espressione o meno della proteina di adesione E-caderina).

Le strutture duttali sono caratterizzate da stabilità; al contrario, le TDLU sono prettamente dinamiche, seguendo le fasi del ciclo mestruale e sotto stimolo ormonale estrogenico vanno incontro a proliferazione, mentre nella fase progestinica vanno incontro a regressione.

Le forme tumorali più frequenti sono il *carcinoma duttale* ed il *carcinoma lobulare*, così chiamati perché inizialmente si pensava che si originassero, rispettivamente, dalle cellule che rivestono i dotti galattofori e dai lobuli che forniscono il latte alla mammella. Per entrambi i tipi tumorali si distinguono una forma *in situ* ed una forma *infiltrante*.

Grazie allo sviluppo di avanzate metodologie di screening mammografico, è possibile diagnosticare lesioni di tipo iper-plastico proliferativo ed alterazioni precancerose. Tra le principali tipologie di lesioni si ricordano gli indicatori di rischio ed i precursori non obbligati [Marchiò et al.,2017].

Un *indicatore di rischio* è una lesione che si verifica a causa di una lesione maligna, mentre un *precursore non obbligato* è una lesione preneoplastica avente un potenziale di trasformazione in lesione maligna. Quest'ultimo ha caratteristiche istologiche, immunofenotipiche e molecolari identiche a quelle del carcinoma associato, ma definito "non obbligato" perché la probabilità di progredire in carcinoma invasivo non è sempre al 100% [Lopez-Garcia et al.,2010]. Una caratteristica propria di queste lesioni è l'espressione costante di recettori estrogenici (ER) e di recettori progestinici (PgR), associata alla non espressione del recettore 2 per il fattore di crescita epidermico (HER2).

Il duttale rappresenta circa il 75% dei tumori infiltranti, mentre il lobulare circa il 5%.

Il passaggio dal tessuto sano allo sviluppo di un tumore *in situ* avviene attraverso la formazione di lesioni intermedie, diverse per i due principali tipi tumorali sopracitati, indicate come lesioni preneoplastiche. L'iter che va dalle lesioni preneoplastiche alle metastasi, passando dal

carcinoma *in situ* e quello infiltrante, rappresenta la genesi e l'aspetto morfologico della cosiddetta progressione tumorale.

Neoplasia lobulare intraepiteliale

Con il termine “neoplasia lobulare intraepiteliale” si includono l'iperplasia lobulare atipica ed il carcinoma lobulare *in situ*.

Il carcinoma lobulare *in situ* (CLIS) è composto da una popolazione monomorfa di piccole cellule che espandono le TDLU, con o senza coinvolgimento dei dotti terminali (Figura 1.4). Il termine “iperplasia lobulare atipica” è stato coniato per riferirsi a lesioni morfologicamente simili ma con parziale coinvolgimento degli acini da parte delle cellule della neoplasia lobulare. Entrambi perdono l'espressione della E-caderina [Hanby et al., 2008]. La neoplasia lobulare, come altre lesioni della “famiglia di neoplasie della mammella di basso grado”, è caratterizzata dall'espressione di ER e di PgR e solitamente è HER2-negativa [Hanby et al. 2008, Reis-Filho et al. 2007]. Iperplasia lobulare atipica e CLIS sono stati accettati come indicatori di rischio di sviluppo del carcinoma mammario [Page et al., 2003]. L'evidenza clinica e molecolare disponibile suggerisce che queste lesioni siano entrambe indicatori di rischio e precursori non obbligati del carcinoma mammario. La propensione, però, della neoplasia lobulare a progredire verso un tumore invasivo è bassa.

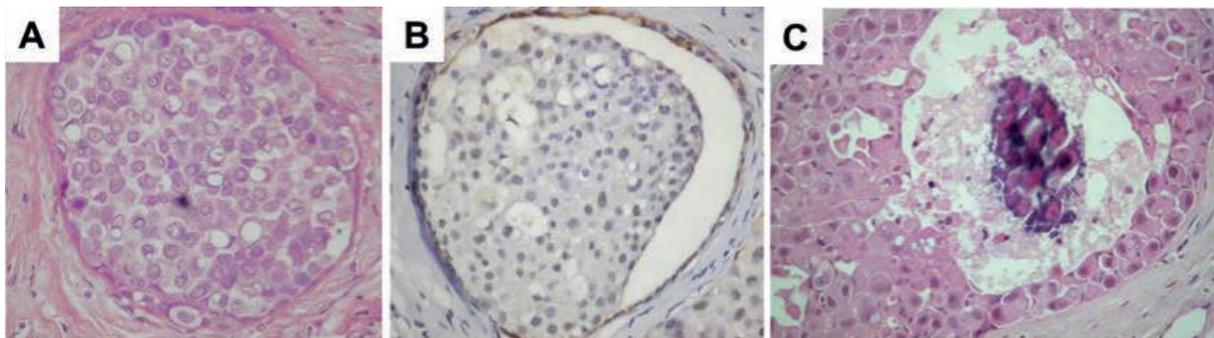


Figura 1.4 : Carcinoma lobulare *in situ* di tipo classico (A), con perdita di espressione della caderina-E (B); carcinoma lobulare *in situ* di tipo pleomorfo (C).

Iperplasia duttale atipica e CDIS di basso grado

Il CDIS di basso grado è caratterizzato da una proliferazione di cellule monomorfiche con nuclei di dimensioni uniformi e figure mitotiche che crescono in arcate con un pattern solido (Figura 1.5) [Lakhani et al.,2012].

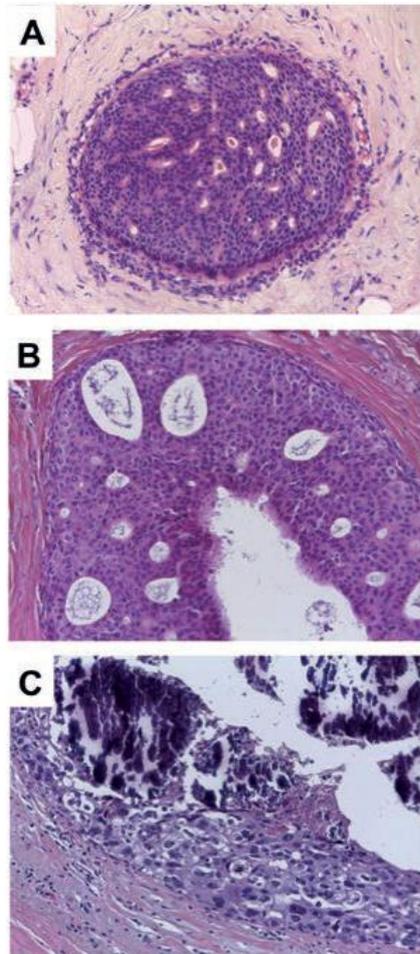


Figura 1.5: *Carcinoma duttale in situ di basso grado (A), di grado intermedio (B) e di alto grado nucleare (C).*

Le lesioni classificate come iperplasia duttale atipica mostrano alcune ma non tutte le caratteristiche morfologiche del CDIS di basso grado. La distinzione tra CDIS di basso grado e iperplasia duttale atipica è principalmente quantitativa, [Lakhani et al.,2012] e il rischio di carcinoma mammario invasivo riportato per CDIS di basso grado è maggiore rispetto a quello per l'iperplasia duttale atipica [Lopez-Garcia et al.,2010]. Quest'ultima è stata a lungo riconosciuta come un indicatore di rischio e un precursore obbligato di CDIS e carcinoma mammario invasivo. Entrambe le lesioni sono positive per ER e PgR, non presentano

overespressione/amplificazione di HER2, e non esprimono citocheratine ad alto peso molecolare, quindi fanno parte della “famiglia di lesioni neoplastiche della mammella di basso grado” [Abdel-Fatah et al., 2007, 2008].

CDIS di alto grado

Il CDIS di alto grado è composto da una popolazione di cellule atipiche con marcato pleomorfismo nucleare, disposte in molteplici configurazioni spaziali (figura 1.5). È una lesione che ha una propensione a progredire verso il cancro invasivo [Hughes et al.,2009].

Una diagnosi di CDIS di alto grado è associata a un rischio significativamente più elevato di sviluppare un carcinoma mammario invasivo e recidive precoci rispetto al CDIS di basso grado.

CLIS pleomorfo

Il carcinoma lobulare *in situ* pleomorfo (CLIS pleomorfo) mostra caratteristiche citologiche e architetturali sia del CLIS classico che del CDIS di alto grado (figura 1.4). Il pattern di crescita presenta grandi cellule prive di coesione [Chen et al.,2009]. Il CLIS pleomorfo è caratterizzato da un moderato indice di proliferazione. Queste lesioni spesso mostrano bassi livelli di espressione di ER e PgR, perdita dell'espressione di E-caderina e, occasionalmente, presentano overespressione e amplificazione di HER2 [Chivukula et al.,2008]. Studi molecolari hanno dimostrato che il CLIS pleomorfo e il carcinoma lobulare invasivo pleomorfo presentano profili genetici molto simili. In generale, le evidenze molecolari disponibili al momento suggeriscono che il CLIS pleomorfo sia una lesione geneticamente avanzata ed è probabile che sia un precursore non obbligato del carcinoma lobulare invasivo pleomorfo.

La neoplasia in stadio iniziale si riferisce al cancro confinato nel tessuto adiposo del seno (stadio 1). Il tumore, in seguito, a causa dell'anatomia della mammella, può diffondersi nelle immediate vicinanze (stadio 2), estendersi ai tessuti toracici (stadio 3) e quindi ad altre parti del corpo (stadio4). Queste cellule maligne, crescendo autonomamente, riescono ad infiltrarsi nei tessuti e negli organi circostanti, a migrare in altri distretti corporei fino ad annidarsi e formare metastasi.

Esistono, inoltre, diversi tipi di cancro alla mammella con tassi di crescita e risposta alla terapia differenti. È opportuno, quindi, sottoporre il tessuto tumorale a specifici test per determinare il tipo di neoplasia.

1.3 TESSUTO OSSEO

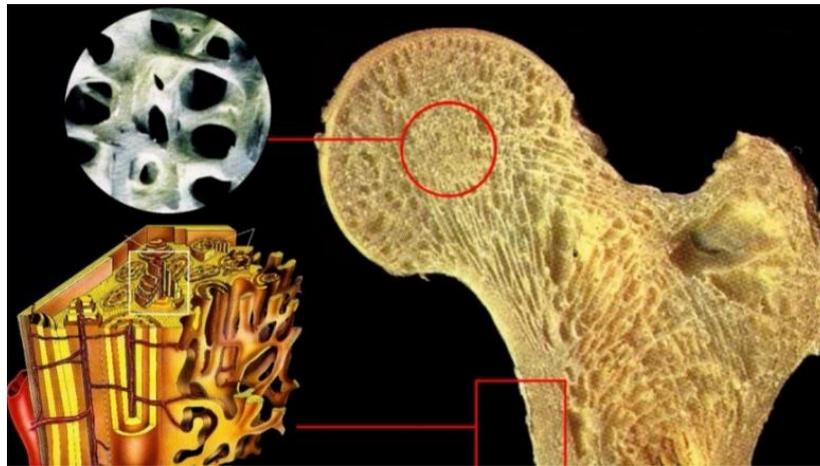


Figura 1.6: *Tessuto corticale e trabecolare.*

Il tessuto osseo è un tessuto composito laminare, caratterizzato da un'elevata attività metabolica e soggetto ad un continuo rimodellamento. L'osso presenta una struttura ottimizzata: esternamente è costituito da un tessuto laminare, spesso e ad alto contenuto metabolico; internamente, invece, si ha una struttura trabecolare e spugnosa deputata principalmente alla funzione di ammortizzare i carichi.

La matrice ossea è composta da:

- una componente organica (1/3), caratterizzata da collagene e lipidi, che rappresenta la parte resistente;
- una componente inorganica (2/3), caratterizzata da carbonato di calcio e fosfato (HA), che rappresenta la parte rigida e fragile.

Component	Site or specific molecule	Volume, %
Water, 25%	Bonded to collagen	60
	Other	40
Organic matrix, 32%	Collagen	89
	Proteoglycan	1
	Other organic molecules: e.g., osteocalcin, <1%; osteonectin, <1%	10
	Apatite mineral, 43%	In gaps between collagen ends
	Intrafibrillar	58
	interfibrillar	14

Figura 1.7: *Componenti principali del tessuto osseo.*

Il collagene è una proteina strutturale, caratterizzata da un'architettura gerarchica le cui fibre hanno lo scopo di limitare le deformazioni e prevenirne le rotture meccaniche.

La sua struttura base è costituita da tre amminoacidi principali (glicina, prolina, idrossiprolina) arrangiati secondo questo ordine. I polimeri lineari di collagene interagiscono tra loro sotto forma di tripla elica, mentre le varie triple eliche sono tra loro arrangiate da legami idrogeno formando le fibrille di collagene. Queste ultime formano a loro volta fibre di diametro pari a $0.2\div 1.2\ \mu\text{m}$. Le fibre di collagene sono molto stabili chimicamente ed hanno elevate proprietà meccaniche che conferiscono una specifica capacità di resistenza a trazione.

La fase minerale della matrice ossea consiste di microscopici cristalli di apatite di calcio e fosforo $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. I cristalli di apatite sono aghiformi ed hanno lunghezza pari a $20\div 40\ \text{nm}$ e spessore di $1.5\div 3\ \text{nm}$. Sono immersi in una matrice di fibre di collagene formando dei fogli lamellari distribuiti ad elica rispetto all'asse dell'osteone, l'unità strutturale dell'osso.

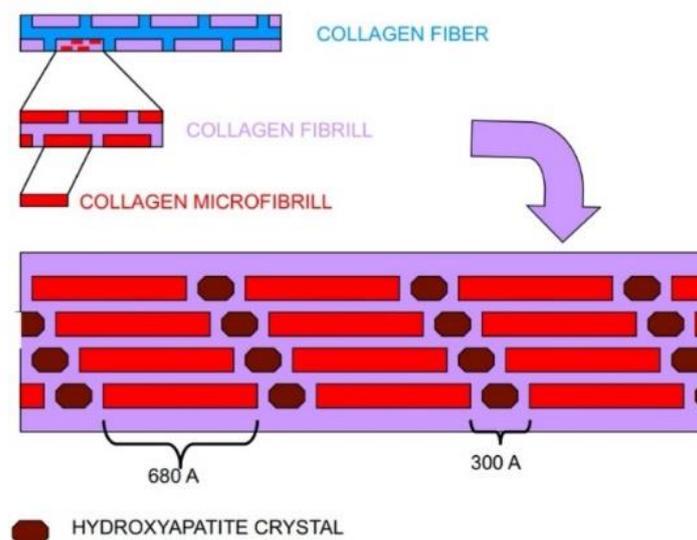


Figura1.8: *Composizione matrice ossea.*

Il bilancio delle attività fisiologiche ed omeostatiche è garantito dalla presenza di 3 componenti cellulari:

- osteoblasti responsabili della formazione ossea;
- osteoclasti deputati alla disgregazione della matrice ossea;
- osteociti che regolano il rimodellamento osseo in risposta a stimoli ormonali e meccanici, bilanciando l'omeostasi.

Il *rimodellamento osseo* è un fenomeno tale da permettere all'osso di ottimizzare la sua forma in funzione del carico applicato a cui deve resistere.

Per ottimizzazione ossea si intende la capacità di sviluppare, in una determinata regione, una resistenza a particolari forze applicate lungo direzioni diverse durante le attività quotidiane. Il femore, ad esempio, è capace di resistere a carichi applicati durante le attività quotidiane, ma anche di assorbire grandi quantità di energia in caso di forti impatti [Cristofolini et al.,2014].

La forza e la dimensione delle sezioni ossee, quindi, hanno capacità adattive in risposta alle sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto. Tale fenomenologia va sotto il nome di *legge di Wolff* ed è riassunta dalle seguenti tre leggi qualitative:

1. il rimodellamento osseo è governato da sollecitazioni flessionali, non dagli sforzi principali;
2. il rimodellamento osseo è stimolato da carichi ciclici dinamici, non da carichi statici;
3. la flessione dinamica produce una crescita della matrice ossea in tutte le zone in cui la suddetta causa una concavità.

Il principio alla base del rimodellamento osseo sembra essere regolato da un meccanismo di retroazione secondo cui le cellule del tessuto connettivo osseo sentono lo stato di deformazione della matrice ossea che le circonda e determinano l'aggiunta o l'eliminazione di tessuto osseo così da mantenere la deformazione all'interno dei valori nominali. La figura 1.9 mostra come il meccanismo di retroazione tenderebbe ad operare: ad ogni sollecitazione percepita corrisponde una deformazione (ϵ) che viene confrontata con i valori nominali e successivamente verificato che non superi il valore massimo (ϵ_{max}) e non sia minore del valore minimo di deformazione ossea (ϵ_{min}). In caso contrario, si agirebbe, rispettivamente, con un riassorbimento o una crescita ossea della sezione resistente.

I processi mediante i quali gli osteociti sono in grado di sentire le deformazioni non sono del tutto noti. Si è ipotizzato che l'osso generi un campo elettrico, grazie alle sue proprietà piezoelettriche, quando è sottoposto ad una sollecitazione meccanica e che tale campo elettrico sia il segnale di attivazione per il rimodellamento osseo. Esistono anche altri meccanismi, fra questi si ricordano lo scorrimento relativo delle lamelle ossee, lo scorrimento delle linee di cemento fra gli osteoni, gli effetti dello stato di sforzo o sulla pressione idrostatica dei liquidi nel tessuto osseo o direttamente sugli osteociti [Pietrabissa et al.,2010].

Wolff's law - remodelling

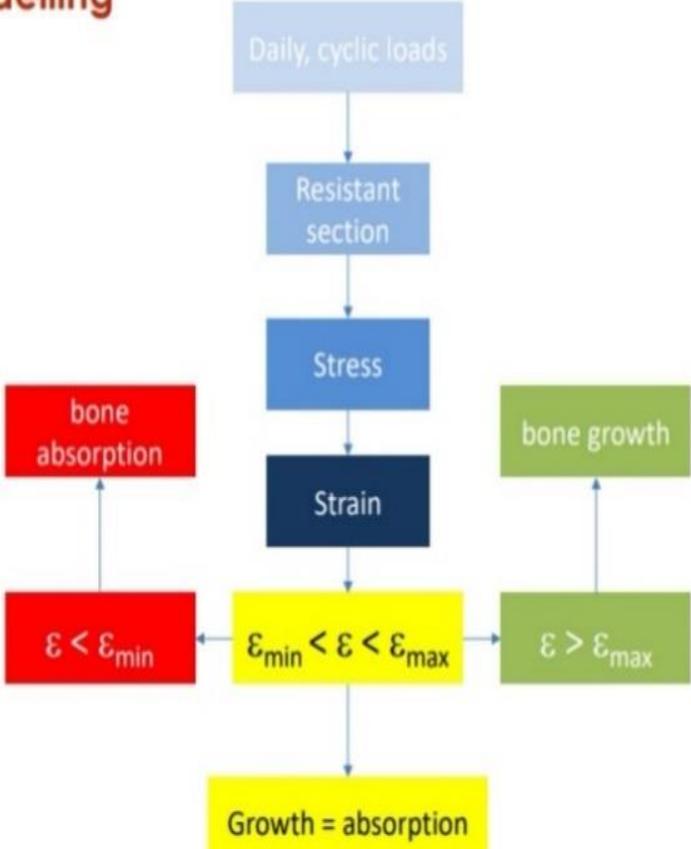


Figura 1.9: Rimodellamento osseo

1.4 PANORAMICA DEL TESSUTO OSSEO METASTATICO.

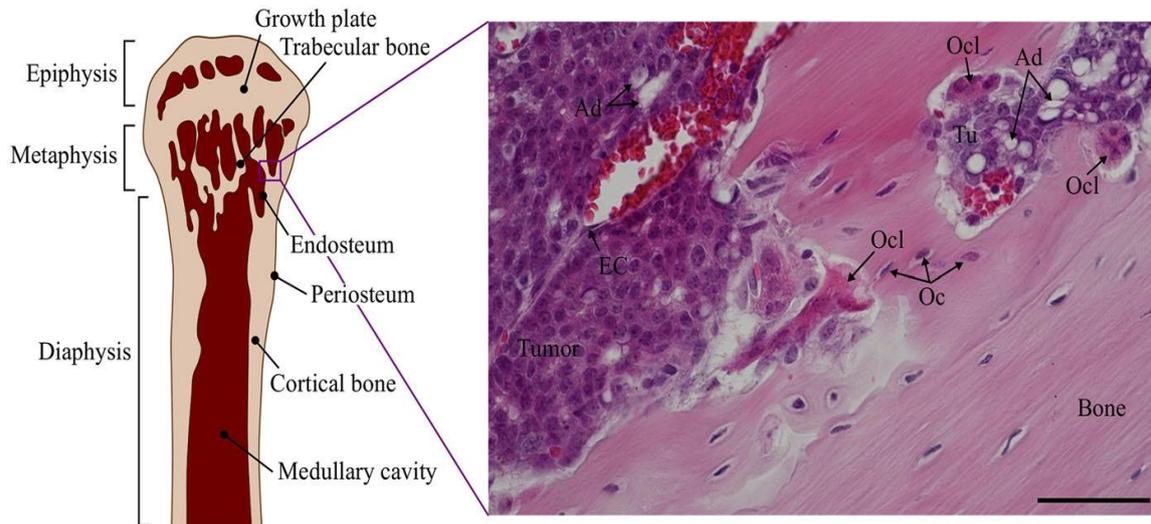


Figura 1.10: *Tessuto osseo metastatico.*

Il tumore osseo metastatico è una patologia che non si origina nell'osso stesso, ma è causata da cellule tumorali migrate in questo distretto corporeo, provenienti da organi diversi dove si è sviluppato un tumore solido primario: mammella, prostata, polmone, rene e mieloma multiplo.

L'osso-metastasi è un fenomeno che riguarda maggiormente le popolazioni ossee ricche di tessuto mieloide e di tessuto osseo trabecolare, le quali costituiscono un ottimo terreno di crescita per la cellula tumorale a causa, probabilmente, dell'elevata vascolarizzazione e rigenerazione presente. E' un fenomeno che frequentemente si viene a sviluppare nelle vertebre, nelle pelvi, nelle costole e nelle estremità delle ossa lunghe [Fornetti et al.,2018].

Le metastasi ossee, nella maggior parte dei casi, non danno sintomi e vengono scoperte nel corso di esami eseguiti per altre ragioni oppure nel corso degli approfondimenti che servono per definire lo stadio di un tumore primario. Nei restanti casi, si possono verificare quelli che gli esperti chiamano “*eventi scheletrici correlati*”. Il sintomo principale è il *dolore osseo*, che inizialmente si manifesta ad intervalli irregolari, per poi diventare continuo, presentandosi anche a riposo o durante la notte. Durante la progressione tumorale l'osso diventa più fragile, fino ad aumentare l'insorgenza di fratture. Quando le metastasi colpiscono la colonna vertebrale, si può verificare la

compressione midollare: il midollo viene compresso dalle cellule tumorali, interferendo con i nervi che controllano il movimento, le sensazioni e le attività di vescica e intestino. Si verifica quindi la difficoltà a camminare o a muovere le braccia, fino ad arrivare alla paralisi, nei casi estremi. Infine, a causa delle metastasi, il calcio contenuto nelle ossa si può riversare nel sistema circolatorio, dando origine ad ipercalcemia.

Come descritto nel precedente paragrafo, l'osso ha una struttura complessa ma favorevole all'insorgere di metastasi. In particolare, nel 1889 da Stephen Paget formulò la teoria del “*seed and soil*” paragonando l'osso ad un terreno fertile e la metastasi ad un seme pronto ad espandersi.

Per capire meglio la biologia di base dell'osso-metastasi è opportuno definire i tre microambienti coinvolti: il microambiente tumorale primario (PTM), il microambiente di circolazione (CM) ed il microambiente osseo (BM).

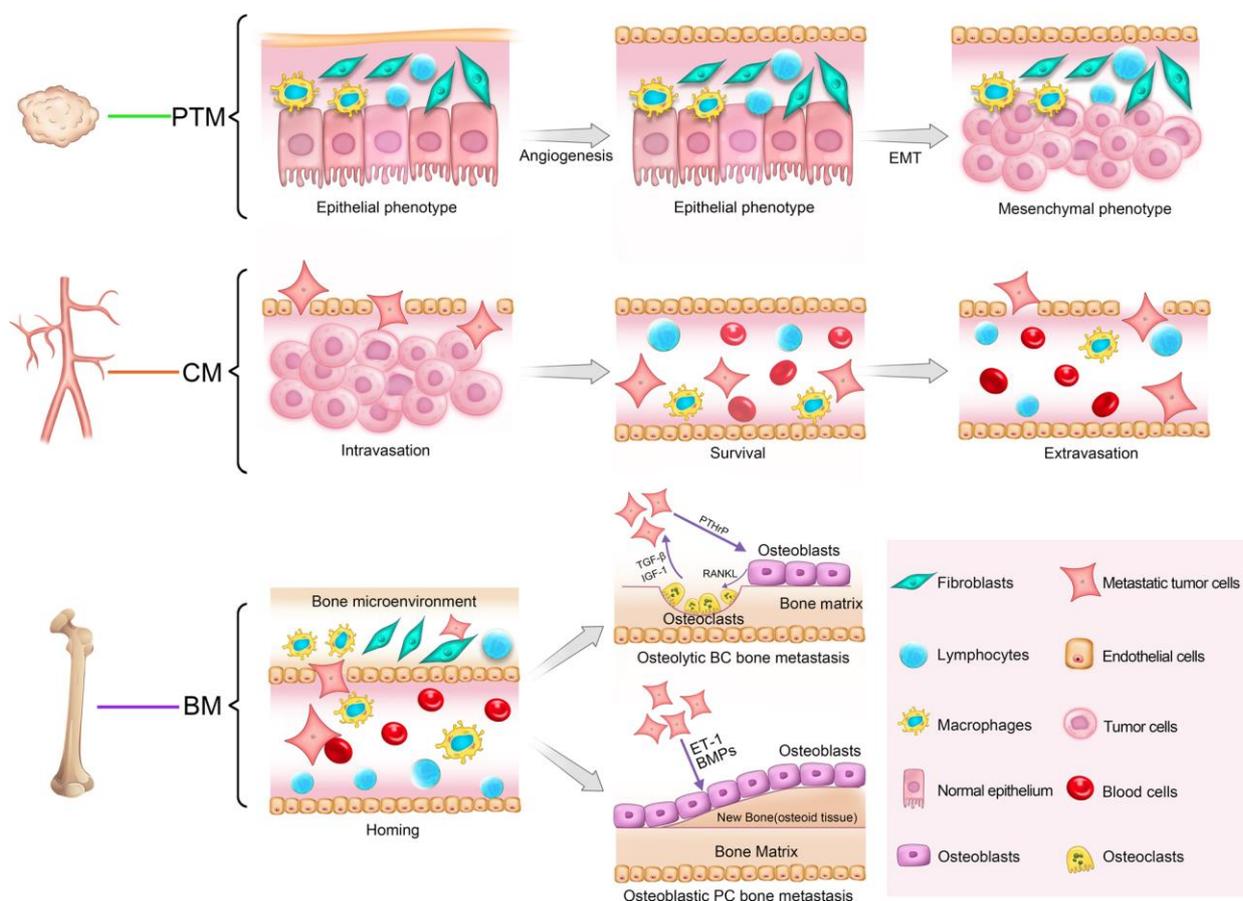


Figura:1. 11: *Illustrazione dei tre microambienti metastatici durante le metastasi ossee osteolitiche ed osteoblastiche.*

L'angiogenesi nel PTM, insieme alla transizione epitelio-mesenchimale, promuove lo sviluppo, l'infiltrazione e la disseminazione delle cellule tumorali nel sistema vascolare. L'attività cellulare nel CM inizia con l'intravasazione, ovvero il susseguirsi di interazioni dinamiche tra le cellule maligne ed il microambiente, determinando un aumento della motilità citoscheletrica, un rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) ed un ampliamento delle lacune endoteliali che accelerano il ritmo migratorio delle cellule tumorali verso ossa lontane. La specie cellulare che riesce ad oltrepassare l'endotelio, dà origine a cellule tumorali in circolazione (CTCs). Tuttavia, meno dell'1% delle CTCs riesce a sopravvivere all'azione distruttiva delle cellule immunitarie all'interno del CM e poi a colonizzare siti secondari. Le CTCs sopravvissute riescono a sovraesprimere recettori di superficie deputati all'attivazione di percorsi necessari per la loro sopravvivenza e per giungere nel BM [Han Qiao et al.,2018]. A questo punto le CTCs entranti nel BM sono diventate cellule tumorali disseminate (DTCs) che possono persistervi in uno stato di dormienza per diversi anni, anche per decenni, prima di svilupparsi in neoplasie evidenti. L'alterazione dell'omeostasi ossea promuove lo sviluppo di nicchie pre-metastatiche (PMN) (Figura 1.12). La formazione di queste ultime è causata da segnali sistemici secreti dal tumore primitivo tali da alterare la ECM e reclutare cellule stromali, generalmente residenti nel midollo osseo, per fungere da sostegno e per creare un ambiente favorevole per lo sviluppo di cellule maligne nel tessuto osseo. Il ruolo fisiologico delle PMN è promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali insediate, fungendo da serbatoi di cellule metastatiche [Sowder et al.,2019].

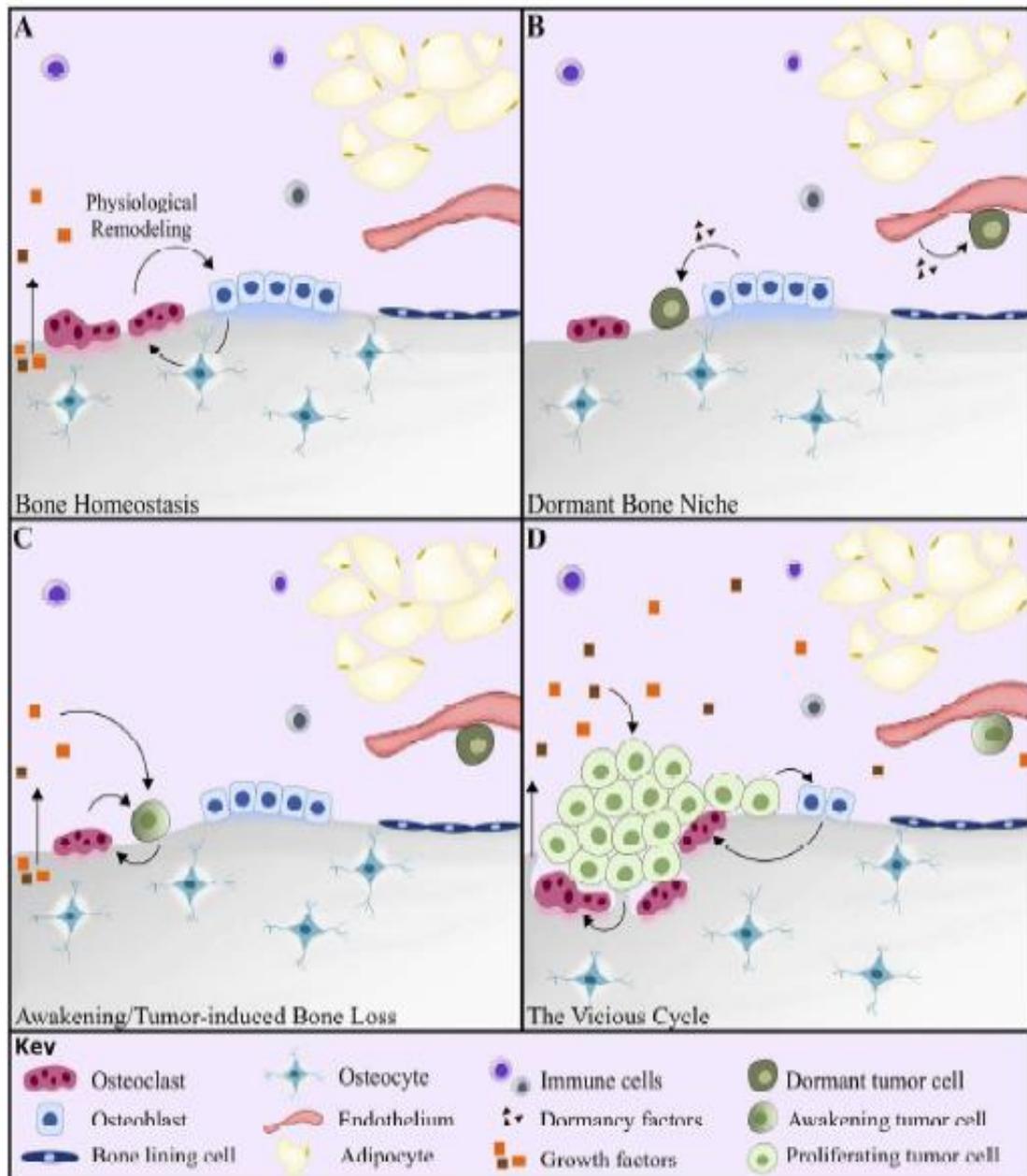


Figura 1.12: *Il microambiente osseo durante il progresso metastatico.*

Principale ruolo delle sub-popolazioni ossee.

Si suppone che uno dei principali fattori scaturenti lo sviluppo metastatico è l'interruzione e l'alterazione omeostatica. E' quindi possibile classificare le metastasi ossee in:

- *osteolitiche*, ovvero, caratterizzate dalla distruzione del normale tessuto osseo (tipico del cancro al seno, polmone e mieloma multiplo);
- *osteoblastiche*, cioè, caratterizzate dalla deposizione di nuovo tessuto osseo (tipico del cancro alla prostata).

Le cellule del tumore al seno spesso si metastatizzano fino ad arrivare a colonizzare il tessuto osseo. A questo punto il tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni è del 10%. La maggior parte delle lesioni metastatiche ossee provenienti dal carcinoma mammario sono osteolitiche, ovvero il riassorbimento è molto più veloce della deposizione ossea. A questa tipologia di metastasi sono frequentemente associati dolori ossei, ipercalcemia, fratture scheletriche e compressione del midollo osseo [Kolb et al.,2019].

Sebbene gli osteociti siano le cellule ossee più abbondanti, rispetto agli osteoclasti e agli osteoblasti, attualmente è poco conosciuto il loro ruolo durante la diffusione metastatica.

Il “*ciclo vizioso osteolitico metastatico*” è uno dei meccanismi meglio noti che porta all’alterazione dell’omeostasi ossea. In questo meccanismo gli osteociti partecipano all’osteoclastogenesi e all’osteoblastogenesi secernendo l’attivatore del recettore RANKL, l’osteoprotegerina (OPG), il fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF) e la sclerostina [Han Qiao et al.,2018]. L’osteoprotegerina inibisce, attraverso il legame con RANKL, il fattore di trascrizione coinvolto nella risposta immunitaria e nell’azione infiammatoria; la sclerostina è una proteina prodotta dagli osteociti il cui scopo è frenare l’attività osteoblastica; le M-CSF sono proteine capaci di stimolare la proliferazione cellulare. L’attività osteoblastica è profondamente alterata dalle metastasi mammarie, ovvero viene deviata la normale funzione di generare nuova matrice ossea e promossa la formazione di citochine capaci di favorire la colonizzazione delle nicchie pre-metastatiche.

Uno studio condotto da Akech et al. 2009, tuttavia, ha identificato il fattore di trascrizione RUNX2 come fattore chiave degli eventi associati a lesioni osteoblastiche. Nell’ultima fase metastatica, gli osteoclasti vengono continuamente attivati mentre, gli osteoblasti non riescono a depositare nuova matrice con conseguente perdita di composizione ossea. Questi risultati suggeriscono che le proprietà e l’attività osteoblastica venga alterata dal microambiente tumorale durante l’ultima fase della malattia.

Kolb et al. 2019 hanno verificato, in particolare, che la produzione di matrice ossea è profondamente alterata dalla formazione di citochine deputate al mantenimento della cellula tumorale, facilitando la colonizzazione della metastasi nell’ultima fase del tumore. Gli osteoblasti, quindi, sono non più deputati alla produzione di matrice ossea, ma diretti dalle cellule tumorali alla produzione di citochine che favoriscono la colonizzazione delle nicchie pre-metastatiche nell’osso.

Si è scoperto che le cellule tumorali agiscono nella nicchia tumorale prima del processo metastatico, alterando l'espressione proteica di una popolazione osteoblastica. L'obiettivo dell'indagine è stato capire l'interferenza che intercorre tra gli osteoblasti e le cellule tumorali nel microambiente osseo.

Sono state identificate due sub-popolazioni osteoblastiche: osteoblasti "educati" (Eos, costituiscono il 20%) che hanno interazioni dirette ed indirette con le cellule tumorali; osteoblasti "ineducati" che non comunicano con le cellule metastatiche. Si ipotizza che gli Eos all'interno del microambiente tumorale osseo, siano i responsabili della produzione di fattori coinvolti nel processo di infiammazione e nel rimodellamento della matrice extracellulare [Kolb et al.,2019].

Quando un tumore solido va a metastatizzare il tessuto osseo, generalmente, è incurabile. Le cellule tumorali lasciando il sito primario, possono impiegare mesi o anni prima di diffondersi in metastasi, in questa circostanza le stesse sono definite *dormienti*.

Il carcinoma mammario è il miglior caso di "*dormienza tumorale*", dove i pazienti ER-positivi possono manifestare recidive anche dopo 10 anni dalla prima diagnosi. E' opportuno quindi porsi tre domande a riguardo:

1. dove si nascondono queste cellule;
2. cosa li tiene in uno stato di dormienza;
3. cosa consente loro di svegliarsi e generare lesioni letali, anche dopo decenni.

L'osso è un importante serbatoio per le cellule dormienti. Le metastasi dal sito primario, attraverso il sistema circolatorio e linfatico, riescono a "*seminare*" il sito secondario.

Inizialmente si pensava che quest'ultimo fosse un evento tardivo dello sviluppo di una neoplasia. Alcuni recenti studi condotti su modelli ingegnerizzati di topi hanno riscontrato che i DTCs sono localizzati nella periferia dell'animale. Durante la fase iniziale della cascata metastatica le cellule tumorali hanno seminato già siti lontani e attraverso "*trigger*", non del tutto conosciuti, esse riescono ad attivarsi.

Capitolo 2

Obiettivi

Nel 2018 in Italia sono stati diagnosticati 52300 nuovi casi di tumore della mammella, pari al 14% di tutti i tumori maligni incidenti totali e al 30% nel solo sesso femminile.

Il rischio di sviluppare un tumore della mammella, nell'arco della vita media, è estremamente alto: riguarda infatti 1 donna su 8.

Questo tumore è il più frequente nel sesso femminile in tutte le fasce di età: rappresenta il 41% delle diagnosi oncologiche prima dei 50 anni, il 35% tra 50 e 69 anni e il 22% nelle donne 70+. L'incidenza appare fortemente correlata all'età: questa patologia è estremamente rara prima dei 25 anni, mentre, la frequenza inizia ad aumentare dopo i 25 anni. In media ci sono circa 5000 nuove diagnosi annue prima dei 45 anni.

Il tasso di mortalità aumenta con l'età, soprattutto dopo i 70 anni: circa un terzo delle diagnosi riguarda questa fascia di età, dove si verifica oltre il 60% dei decessi.

Il cancro al seno risulta inoltre fatale a causa del suo elevato potenziale metastatico durante l'ultima fase della malattia. Questa forma tumorale, generalmente, tende a colonizzare il tessuto osseo, con conseguente alterazione del sistema endocrino, della stabilità meccanica scheletrica e della funzione immunitaria.

L'evoluzione delle metastasi ossee maligne, ad oggi, è stata definita come un processo dinamico multi-step. Questo fenomeno può essere spiegato come una cascata di eventi invasivi, in cui le cellule tumorali subiscono una serie di trasformazioni: partendo dal microambiente tumorale primario, passando per l'invasione locale, l'intravasazione, lo stravasato e giungono, infine, alla colonizzazione del microambiente osseo.

Le metastasi ossee possono causare un significativo stato patologico, generando eventi correlati con l'apparato scheletrico: frattura ossea, compressione del midollo spinale, dolore osseo e ipercalcemia.

L'attenzione di questo lavoro di tesi è rivolta all'analisi ed al confronto di *modelli in vitro* per metastasi ossee derivanti dal carcinoma mammario. Gli scopi principali sono:

- Ottenere la massima informazione sull'interazione dinamica che intercorre tra cellula tumorale e cellula ossea;

- determinare i fenomeni che orchestrano la progressione metastatica;
- identificare targets molecolari, meccanismi di diffusione farmacologica e biomarcatori che si traducono in un miglior trattamento;
- capire il ruolo delle cellule ossee e come esse lavorano ed interagiscono con le cellule tumorali.

Nel nostro corpo, le cellule cancerogene risiedono in un'architettura tridimensionale (3D) all'interno di un microambiente che le ospita. I *metodi standard* di ricerca nel settore oncologico riguardano l'utilizzo di colture cellulari e modelli animali, successivamente convalidati da un *clinical trial*. Tuttavia, vi sono innumerevoli differenze tra una coltura *in vitro* ed una *in vivo*. In particolare, il sistema *in vitro* più comune per la caratterizzazione e lo studio degli eventi e dei segnali che insorgono durante il progresso metastatico è la coltura di una linea cellulare del carcinoma mammario su un disco planare di plastica 2D. Questo approccio è sicuramente uno dei più convenienti dal punto di vista economico, ma è intrinseco di molti limiti: le cellule diventano piatte discostandosi dalla loro normale morfologia, la maggior parte delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice si vengono a perdere, non riescono ad imitare l'ambiente fisiopatologico presente *in vivo*. Dall'altra parte, i modelli animali, riproducono un microambiente tridimensionale dove cellule tumorali umane o piccoli frammenti di tessuto possono essere trapiantati per facilitare la crescita delle metastasi. Tuttavia, il loro limite principale è l'eccessivo costo e la mancanza di un sistema immunitario.

Un miglioramento dei modelli tumorali *in vitro* è stato ottenuto attraverso la realizzazione di modelli 3D basati su biomateriali ottimizzati. Questi, negli ultimi decenni, hanno significativamente colmato il divario tra i modelli di coltura 2D e i modelli animali *in vivo*. Infatti, le colture cellulari 3D sono molto più veritiere delle 2D per la loro elevata capacità di simulare la struttura tumorale, permettendo una corretta interazione cellula-cellula e cellula-matrice.

Tuttavia, i sistemi 3D presentano dei limiti strutturali che portano ad una scarsa diffusione di fattori importanti come ossigeno, nutrienti e sostanze di scarto.

A tal proposito, l'avvento dei sistemi di coltura dinamica (bioreattori) ha consentito di riprodurre *in vitro* modelli 3D che possano essere coltivati in presenza di stimoli biochimici e biomeccanici, normalmente presenti *in vivo*.

Quanto descritto, permette quindi di accelerare la ricerca oncologica al fine di ottenere terapie farmacologiche sempre più efficaci ed efficienti.

Capitolo 3

MODELLI IN VITRO DI METASTASI OSSEE

3.1 COLTURA CELLULARE 2D VS 3D

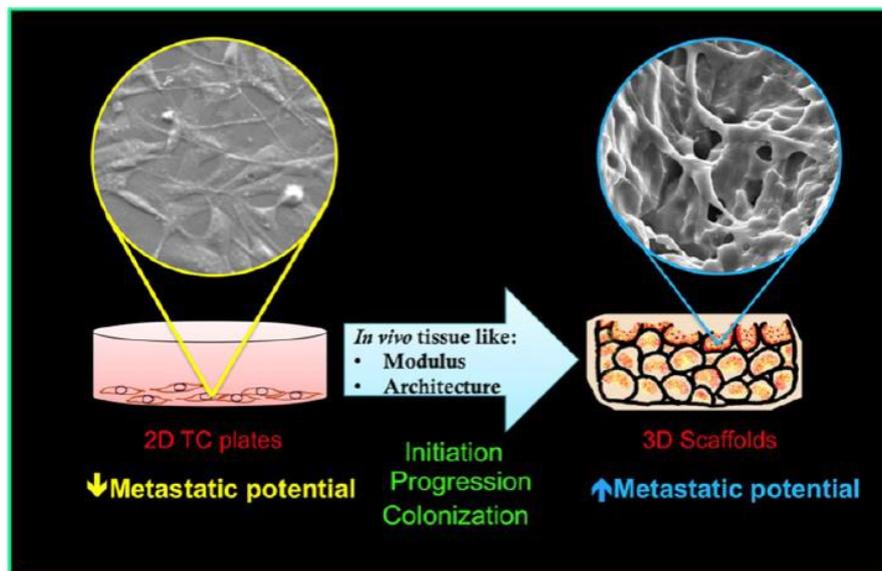


Figura 3.1: Differenze tra una coltura 2D ed una 3D.

La coltura cellulare *in vitro* è una metodologia che permette di studiare fenomeni biologici come la crescita, il differenziamento, l'effetto dei farmaci o della cancerogenicità di alcune sostanze in un ambiente semplificato e controllato.

Le colture cellulari 2D costituiscono “modelli tradizionali” per la ricerca, infatti, sono state utilizzate per più di un secolo per studiare la fisiologia cellulare, i segnali biochimici e biomeccanici; dalla loro applicazione deriva la stragrande maggioranza delle nozioni biologiche presenti oggi. I *metodi standard* di ricerca utilizzano strutture bidimensionali, come le piastre di Petri o multi-pozzetto, per conferire un supporto strutturale alla cellula. Tipicamente le cellule sono esposte ad una superficie priva di difetti, la cui rigidità, però, influenzerà il suo sviluppo: diminuzione della trascrizione genica e un rapido mutamento morfologico [Duval et al.,2017]. Questi modelli non sono quindi in grado di riprodurre

accuratamente le condizioni *in vivo* e sono soggette a numerose limitazioni, quali differenze nell'adesione e migrazione cellulare, nell'organizzazione del citoscheletro, nella mancanza della polarizzazione cellulare. Inoltre, risulta evidente la mancanza dell'articolata interazione dinamica tra le cellule ed il loro ambiente o la loro organizzazione spaziale in contesti fisiologici. Ne consegue che i risultati ottenuti riducono l'affidabilità della ricerca svolta.

Nell'ambito della ricerca oncologica gli approcci "tradizionali" prevedono l'utilizzo di modelli 2D e modelli animali, i quali sono scarsamente correlati con lo stato patologico umano. Infatti, questi tendono a semplificare drasticamente il contesto biologico di un tumore, che è normalmente influenzato dai segnali d'azione del microambiente circostante e dalle caratteristiche intrinseche delle molecole. Inoltre, il deficit dell'espressione genica, proprio della coltura bidimensionale, induce un'alterazione dell'angiogenesi, della migrazione e dell'invasione metastatica.

Le colture bidimensionali non riescono quindi a simulare l'eterogeneità e i meccanismi che sono alla base del cancro. Da questi notevoli ostacoli, nasce l'esigenza di sviluppare un modello tridimensionale spesso chiamato anche coltura sferoidale o organoidale, in grado di riprodurre il più similmente possibile il microambiente fisiologico e ricreare l'interazione dinamica cellulare.

La maggior parte delle cellule risiedono infatti all'interno di una matrice extracellulare (ECM). Questa particolare struttura cellula-matrice risulta apparire come una complessa architettura tridimensionale. E' infatti noto come la morfologia delle cellule coltivate in 2D e 3D risulta profondamente diversa. Questo dipende dall'ambiente di coltura, che costituisce di per sé uno stimolo in grado di indurre cambiamenti biochimici e biomeccanici, influenzando il comportamento cellulare. In particolare, le colture cellulari in sistemi 3D mostrano comportamenti come l'adesione, la migrazione, l'espressione genica e la morfogenesi che si discostano molto da quelli sviluppati in colture bidimensionali, risultando essere un potenziale strumento che meglio approssima i sistemi biologici.

Ne consegue un ambiente di studio più verosimile a quello naturale e quindi una più accurata valutazione dei processi fisiologici, nonché lo studio di nuovi farmaci e protocolli sperimentali. Esistono diverse tecniche per la realizzazione di matrici 3D. Duval et al. 2017, le hanno analizzate e confrontate, riscontrando come personalizzare la composizione biochimica del materiale, l'elasticità della matrice e la micro-architettura porti a notevoli vantaggi. A tale fine, possono essere impiegati metodi all'avanguardia come, ad esempio, la stampa 3D basata su stereolitografia. Questi processi tecnologici potrebbero però danneggiare la struttura cellulare a causa dell'elevata pressione o dell'utilizzo di solventi chimici.

Nuovi approcci tecnologici, definiti “*blocks-based scaffold*”, superano alcune inefficienze delle metodologie precedenti prestando attenzione alla porosità, alle caratteristiche meccaniche e alle proprietà della ECM.

Modelli 3D opportunamente validati potrebbero progressivamente sostituire la sperimentazione animale, portando sia ad una riduzione dei costi che ad un miglioramento dell’analisi, che non risentirebbe delle differenze tra il modello animale scelto e l’uomo. Essi, tuttavia, sono caratterizzati da una maggiore complessità e da esigenze aggiuntive, quali la necessità di garantire nutrienti e ossigeno alla cellula o la biocompatibilità del supporto. Queste problematiche hanno impedito lo sviluppo di un protocollo unico per i sistemi di coltura 3D, che risultano essere molto diversificati sia per quanto riguarda la loro produzione che per quanto concerne il loro utilizzo e le loro caratteristiche.

Carvalho et al. 2015, ad esempio, concentrano la loro attenzione sui modelli 3D sviluppati ed utilizzati nella ricerca contro il cancro: valutano il potenziale di modelli basati su scaffold e micro-fluidodinamica, per superare il divario tra i modelli di colture 2D e le applicazioni cliniche, concentrandosi sull’utilizzo dei biomateriali.

L’attuale stato dell’arte sull’utilizzo di modelli 3D impiegati per la ricerca contro il cancro ha portato alla scoperta di nuovi farmaci. In particolare, si presta attenzione all’utilizzo di modelli basati su scaffold di natura sintetica o biologica. Infatti, in questi ambienti, le cellule tumorali tendono a svilupparsi in strutture tridimensionali, adottando una forma sferoidale e generando dei cluster così come avviene *in vivo*.

3.2 MODELLI BIDIMENSIONALI

Krishnan et al. 2011, hanno condotto uno studio sulle interazioni dinamiche tra le cellule metastatiche del carcinoma alla mammella ed il tessuto osteoblastico, caratterizzato da un ampio range di maturità osteoblastica, ovvero dalla specie immatura alla forma mineralizzata simile agli osteociti. Per il tessuto osseo è stata utilizzata la linea cellulare pre-osteoblastica MC3T3-E1, mentre per il tumore è stata utilizzata la linea neoplastica ad alta malignità MDA-MB-231.

Per l'esperimento, le cellule MC3T3-E1 sono state seminate con una densità di 10^4 cellule/cm² all'interno di una piastra Petri e in presenza di un terreno di coltura per proliferazione e differenziamento. Le cellule metastatiche del carcinoma mammario (BC), sono state aggiunte agli osteoblasti (OB) e co-coltivate con tre quantità diverse di BC in OB: 1:10, 1:100, 1:1000.

Gli osteoblasti sono cresciuti per 4, 14 e 24 giorni, ovvero giorni indicativi per la fase iniziale, intermedia e tardiva della differenziazione. Le cellule MDA-MB-231 sono state invece aggiunte e coltivate per sette giorni. La coltura è stata monitorata con una microscopia confocale al giorno 1, 3 e 7 dopo l'aggiunta delle cellule tumorali. Un'ulteriore co-coltura è stata effettuata con osteoblasti del ventiquattresimo giorno alle quali sono state aggiunte cellule tumorali mantenute in coltura per ulteriori 14 giorni. I risultati ottenuti, mostrano che in ogni istante di tempo osservato, le cellule del carcinoma aderiscono al substrato osteoblastico e vi proliferano. La colonizzazione tumorale è influenzata dalla fase di differenziazione osteoblastica e dal rapporto tra BC e OB: gli osteoblasti meno maturi (giorno 4) hanno supportato più facilmente la colonizzazione delle cellule tumorali rispetto a quelli del quattordicesimo e ventiquattresimo giorno (Figura 3.2 (A)). La co-coltura di osteoblasti del ventiquattresimo giorno con cellule tumorali per ulteriori 14 giorni, ha evidenziato invece una colonizzazione di più del 30% dell'intera coltura osteoblastica (Figura 3.2 (B)).

Un cambio di espressione genica è stato osservato nei livelli di osteocalcina (OCN), interleuchina 6 (IL-6) che è un attivatore del RANKL, e leptina. Inoltre, dalle immagini di microscopia si evince una progressione morfologica del differenziamento osteoblastico, durante tutto il periodo di coltura. Ciò è ulteriormente avvalorato dalla promozione della secrezione di geni associati con il fenotipo osseo come l'osteocalcina (OCN), osteonectina (OSN), l'osteopontina (OPN), il collagene di Tipo I, e l' MMP-13 che è un indicatore del ricambio della ECM, altamente espresso dagli osteoblasti maturi (Figura 3.3). In particolare, si

evince come la validità e stabilità cellulare del sistema bidimensionale siano verificate fino al ventunesimo giorno di coltura, dopo il quale è necessario l'introduzione di un modello tridimensionale che sarà trattato nel capitolo successivo.

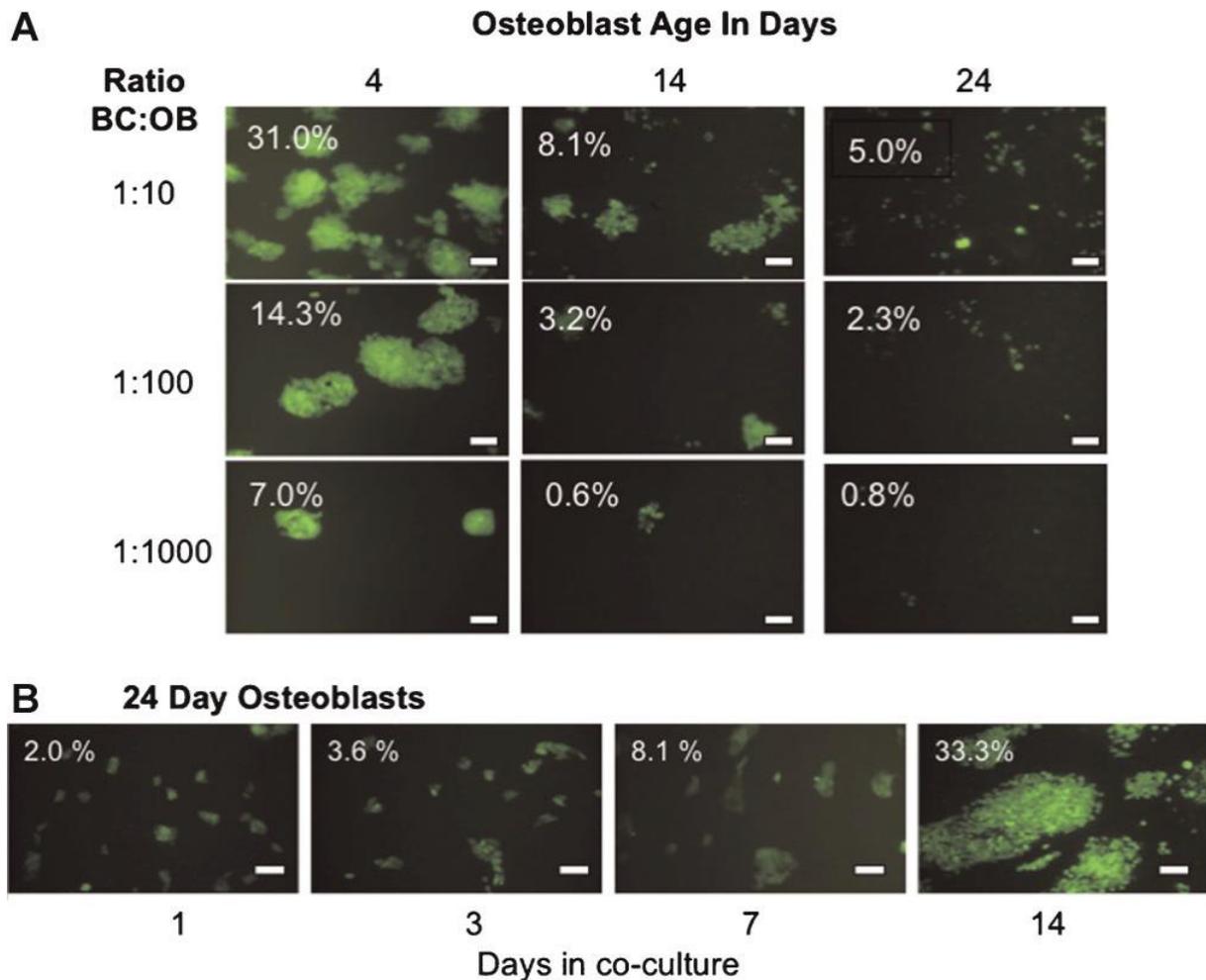


Figura 3.2: Co-coltura bidimensionale di MC3T3-E1 con le cellule metastatiche della neoplasia mammaria, MDA-MB-231. Nelle varie fasi della crescita/differenziazione osteoblastica (giorno 4, 14 o 24), le cellule tumorali sono aggiunte agli osteoblasti con i seguenti tre rapporti: 1:10, 1:100 e 1:1000. (A) La co-coltura è stata effettuata per 7 giorni. Le immagini sono state ottenute con la microscopia fluorescente. I valori indicano la percentuale di area occupata dalle cellule BC. (B) Immagine degli osteoblasti del ventiquattresimo giorno co-coltivati per 1, 3, 7 e 14 giorni con le cellule tumorali (BC:OB 1:10).

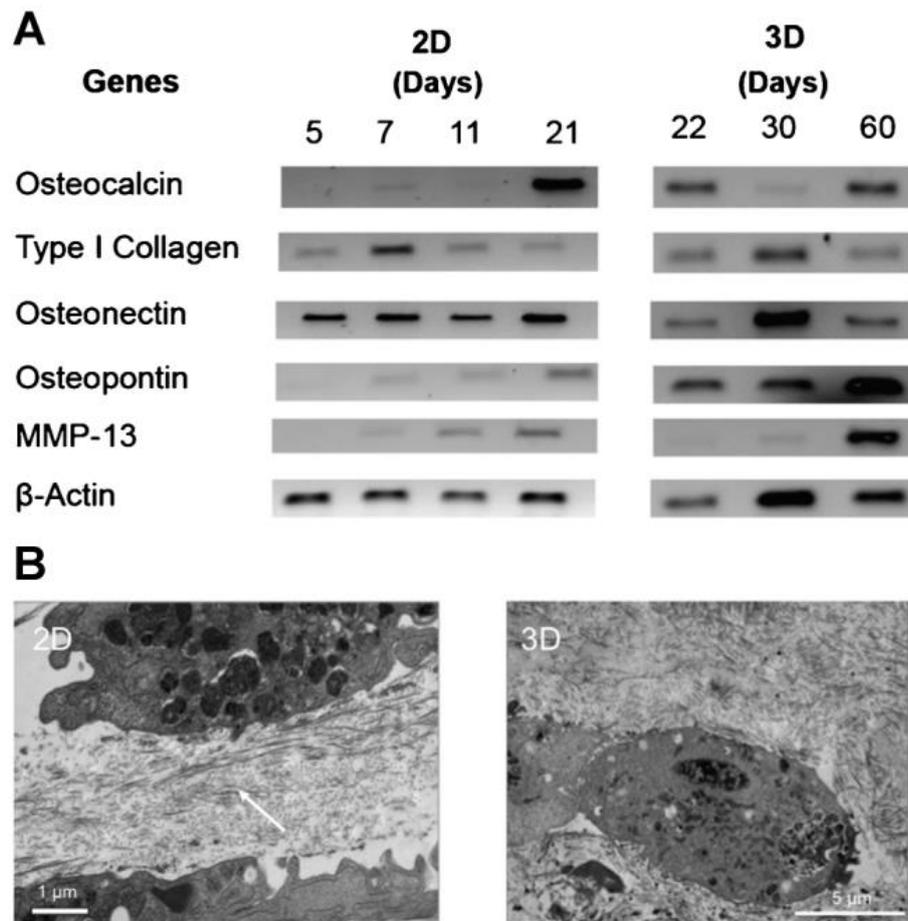


Figura 3.3: *Espressione della differenziazione genica osteoblastica. (A) Le cellule MC3T3-EI in una coltura tissutale in polistirene e in un bioreattore. (B) TEM di MC3T3-EI coltivati nel sistema tridimensionale dopo 15 giorni e nel bioreattore dopo 30 giorni. La freccia indica la matrice extracellulare secreta, nel bidimensionale le cellule*

In generale, è possibile dire che l'età osteoblastica influenza l'abilità della metastasi di penetrare nel tessuto osteoblastico. In particolare, nelle colture più vecchie la neoplasia si diffonde maggiormente che in quelle più giovani.

Un approccio bidimensionale è sicuramente uno dei più convenienti dal punto di vista economico, ma è intrinseco di molti limiti: le cellule diventano piatte discostandosi dalla loro normale morfologia, la maggior parte delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice si vengono a perdere, non riescono ad imitare l'ambiente fisiopatologico presente *in vivo*. Il comportamento cellulare, inoltre, è ampiamente influenzato dalla rigidità del substrato (coltivare su un substrato molto rigido come le piastre di Petri potrebbe alterare il segnale).

3.3 MODELLI TRIDIMENSIONALI

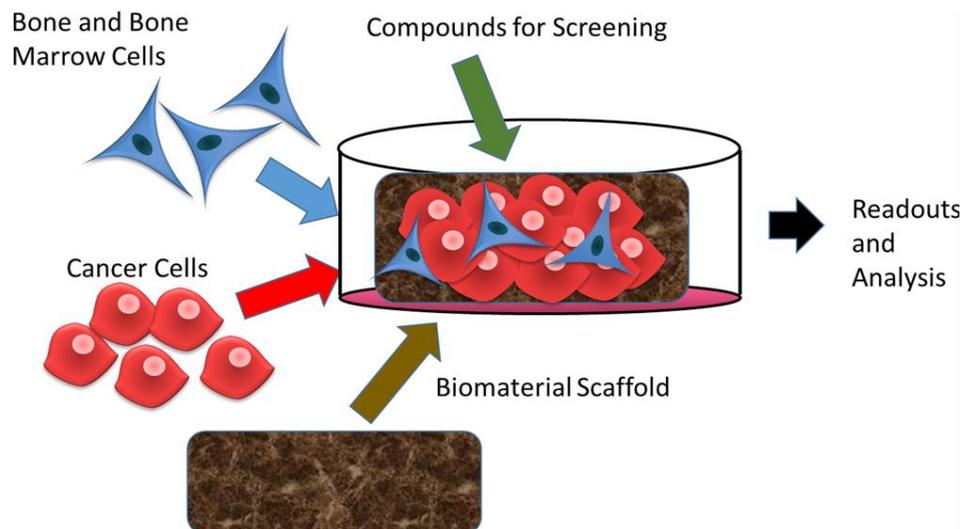


Figura 3.4: *Realizzazione schematica di un modello tridimensionale.*

Lo sviluppo di sistemi tridimensionali, che meglio imitano le proprietà topografiche e meccaniche del tumore, ha reso possibile la realizzazione di un microambiente tumorale *in vitro* per studiare le metastasi derivanti dal carcinoma alla mammella.

Uno scaffold è un robusto supporto strutturale per la coltura cellulare, tale da garantire il corretto trasferimento di segnali meccanici e funzionali favorendo l'adesione cellulare, la proliferazione e la migrazione senza causare infiammazioni o risposte apoptotiche e le cui proprietà simulano la ECM naturale [Sitarski et al.,2018].

Lo scaffold 3D, per poter riprodurre il microambiente fisiologico ed avvicinarsi alle caratteristiche proprie della matrice extracellulare, deve garantire specifiche proprietà quali porosità, biodegradabilità e biocompatibilità in tutti gli stadi di uniformità e degradazione strutturale, nonché un trasporto bidirezionale di nutrienti, prodotti di scarto metabolico e ossigeno.

Biomateriali

Nella scelta del biomateriale da utilizzare per un modello tridimensionale ci sono molte variabili da considerare:

- biocompatibilità e biodegradabilità;
- proprietà meccaniche: rigidità, elasticità/plasticità, viscoelasticità;
- trasporto di massa, ovvero l'accesso ad ossigeno, nutrienti e vari fattori solubili;
- forma e rugosità superficiale;
- tipo: spugnoso o idrogel;
- origine: sintetica o naturale.

I materiali di origine sintetica (e.g. PEG, PLGA) o naturale (e.g. collagene, seta, agarosio) comportano risposte diverse da parte del modello cellulare.

In particolare, i materiali sintetici hanno la peculiarità di poter essere lavorati con differenti processi tecnologici, permettendo di soddisfare particolari esigenze strutturali (e.g. dimensione delle fibre). I materiali naturali, invece, hanno la capacità di promuovere segnali cellula-cellula e cellula-matrice verosimili alla situazione *in vivo*. Inoltre, essi non solo superano i limiti di non degradabilità dei materiali sintetici come metalli e ceramiche, ma superano anche l'azione infiammatoria e la reazione immunitaria di questi ultimi [Da-Wei-Li et al.,2017].

Due categorie di scaffold che ricoprono particolare interesse sono idrogel e aerogel. I primi possono essere costituiti da polimeri naturali come acido ialuronico, collagene, alginato e chitosano. Sono costituiti da reticolati idrofilici che conferiscono proprietà viscoelastiche, risultando quindi degli ottimi candidati come biomateriali per la sostituzione dei tessuti molli. In base alle necessità, la loro rigidità può comunque essere aumentata introducendo fibre di rinforzo o microparticelle. Ne risulta che questa tipologia di scaffold è ampiamente utilizzata per la ricerca oncologica, soprattutto per l'elevato range di proprietà meccaniche e bio-fisiche. Gli aerogel, invece, hanno una struttura spugnosa e sono caratterizzati da uno o più materiali (di origine naturale e/o sintetica) che presentano elevate proprietà meccaniche, garantendo le caratteristiche proprie di un microambiente tumorale. Queste strutture presentano un'ampia area superficiale e favoriscono quindi un'elevata adesione cellulare e un ottimo trasporto di massa bidirezionale; inoltre, l'elevato tempo di degradazione permette di utilizzarli in colture cellulari a lungo termine.

Inoltre, tali matrici 3D, possono essere arricchite con materiale biomimetico. Ad esempio, l'utilizzo di nanoparticelle di idrossiapatite, tende a favorire l'osteointegrazione tra la specie cellulare ospite e l'ambiente circostante, poiché imita la composizione mineraria del tessuto

osseo, svolgendo un'azione importante non solo nella crescita e proliferazione, ma anche nella modulazione genica.

L'obiettivo primario è, quindi, scegliere accuratamente un biomateriale in grado di soddisfare il comportamento cellulare ricapitolando i segnali biochimici, l'ambiente fisiologico e la topografia presente *in vivo*. L'utilizzo di matrici nanocomposite porta inoltre alla formazione di strutture sferoidali, incrementando le interazioni dinamiche e ricreando le caratteristiche tumorali presenti *in vivo*, a differenza di quanto ottenibile con una coltura bidimensionale.

Nella tabella seguente sono racchiusi i principali biomateriali utilizzati per modelli tumorali.

Biomateriale	Tipo di Scaffold	Tipo di tumore
Materiali naturali		
Fibroina di seta	Scaffold, idrogel	Mieloma multiplo, prostata, mammella, osteosarcoma
Collagene	Scaffold, idrogel	Mammella, prostata, osteosarcoma
Citosano-Alginato	Scaffold	Prostata, glioblastoma, carcinoma epatocellulare
Acido ialuronico	Scaffold, idrogel	Carcinoma renale, mieloma multiplo
Nanocellulosa batterica	Scaffold, idrogel	Neuroblastoma, osteosarcoma, prostata, cancro al rene
ECM naturale	Scaffold	Mieloma multiplo, mammella
Citosano (con o senza idrossiapatite)	Scaffold	Mammella
Materiali sintetici		
PEG	Idrogel	Mammella, prostata

PCL	Idrogel	Mammella, prostata, osteosarcoma
Polimeri basati su poli-amminoacidi	Idrogel	Osteosarcoma
PLG non mineralizzato, PLG mineralizzato con idrossiapatite	Idrogel	Mammella

Tabella 3.1: *Biomateriali utilizzati nell'ingegneria tissutale per realizzare modelli tridimensionali del tessuto osseo.*

Porosità

La porosità è un aspetto di notevole importanza, in particolare l'architettura interconnessa che ne deriva favorisce la crescita e la migrazione cellulare all'interno dello scaffold, evitando un sovrappopolamento, che ostacola la crescita cellulare, e favorendo il trasporto bidirezionale delle sostanze nutritive. In qualsiasi sistema tridimensionale, la crescita e migrazione cellulare sono modulate dall'integrazione spazio-temporale dei parametri biologici e biofisici che risentono dell'influenza del microambiente tumorale.

Struttura

Le proprietà fisiche dello scaffold, come la dimensione e la forma dei pori, sono aspetti importanti del suo design. Risulta quindi vantaggiosa la realizzazione di strutture "settabili" che possono essere fabbricate con un preciso controllo della geometria, capace di generare una crescita cellulare come *in vivo*.

Un modello di questo tipo può essere ottenuto attraverso la stampa 3D basata su stereolitografia. Questa tecnologia permette il raggiungimento di una matrice tridimensionale ottimale, tale da originare un ambiente bio-mimetico per lo studio della metastasi ossea *in vitro*.

Modelli 3D per metastasi ossee da cancro alla mammella

Nei modelli 3D per lo studio di metastasi ossee da cancro alla mammella, cellule che danno origine al tessuto osseo (e.g. MSCs) e linea cellulari da tumore della mammella (e.g. MDA-MB-231, MCF-7) vengono coltivate all'interno di scaffold. L'osservazione delle variazioni dei

livelli di espressione genica, dei cambiamenti morfologici, e di tutti quei fattori coinvolti negli eventi quali colonizzazione, stravasamento ed invasione, incrementando il potenziale metastatico, permettono un'analisi del processo metastatico.

Zhu et al. 2015 [Wei Zhu et al., 2015] hanno ottenuto un innovativo scaffold poroso in chitosano contenente cristalli di idrossiapatite di varia dimensione (Figura 3.5), che ha lo scopo di rafforzare la biomimetica del microambiente osseo, ovvero, riprodurre le caratteristiche fisiologiche di innesco della metastasi. Le componenti naturali della ECM, come la porzione inorganica, mineraria, e le varie specie cellulari (osteoblasti, osteoclasti) sono state opportunamente riprodotte. A tale scopo, cellule staminali mesenchimali (MSC) del tessuto osseo umano e alternativamente le linee cellulari MDA-MB-231 o MCF-7 sono state introdotte all'interno del nano modello tridimensionale.

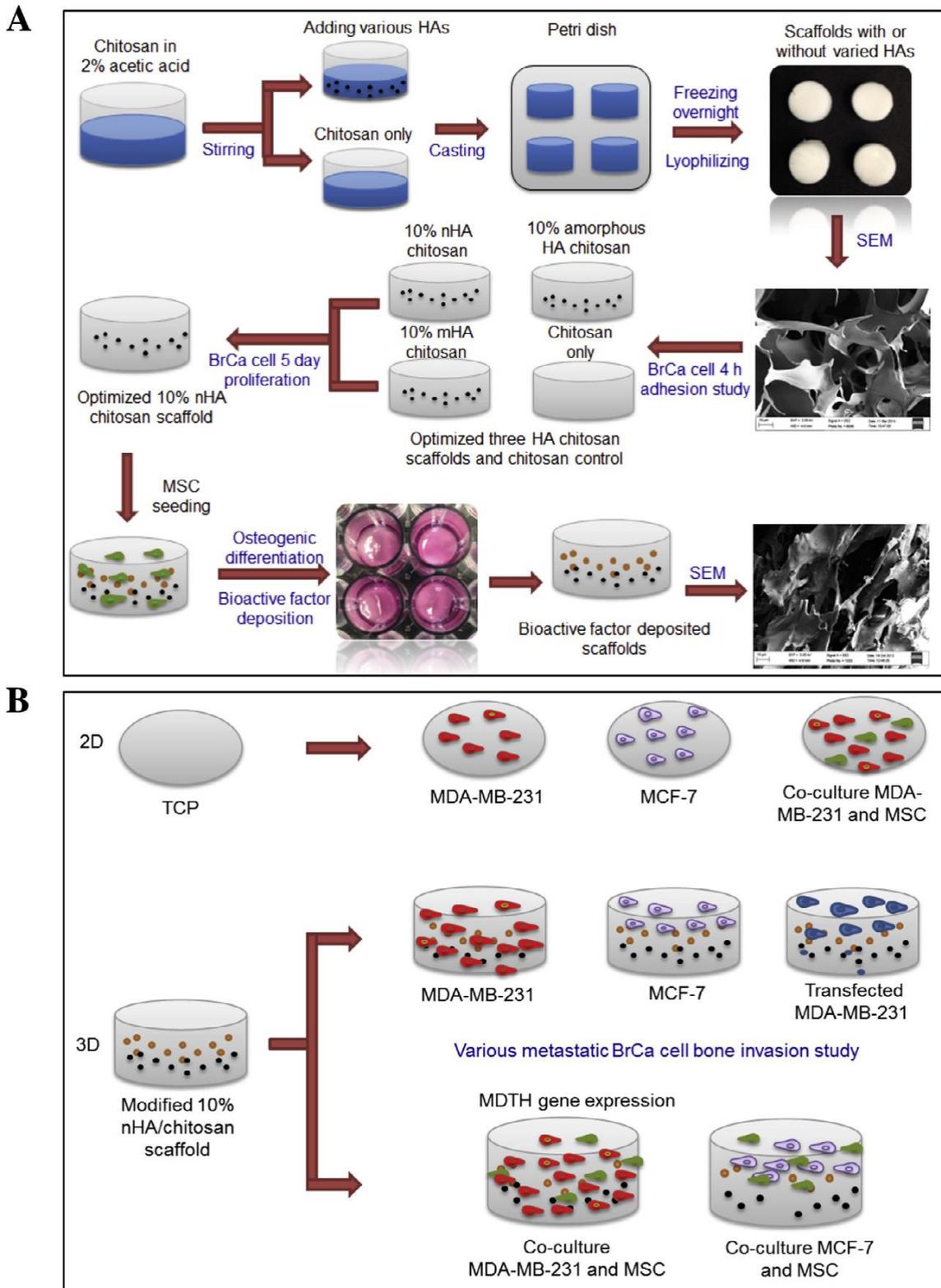


Figura 3.5: *illustrazione schematica della produzione(A) e dell'evoluzione (B) del modello in vitro basato su MSCs.*

Il chitosano è un polimero naturale con una struttura molto simile al glicosaminoglicano, componente principale della ECM, le cui principali caratteristiche sono: rinnovabilità, osteoconduttività, biocompatibilità, biodegradabilità, biofunzionalità, non tossico e non antigenico. Questo materiale non possiede le elevate proprietà meccaniche dei tessuti duri, quindi, necessita di una fase di rinforzo che sia in grado di compensare le sue lacune, per tale scopo generalmente sono utilizzati i materiali ceramici come l'idrossiapatite. Una delle caratteristiche principali è il tempo di degradazione: una robusta struttura in chitosano resiste fino a 55 giorni sostenendo colture cellulari di BrCa e generando risposte clinicamente più rilevanti.

Nel modello realizzato è stata utilizzata una concentrazione di idrossiapatite pari al 10% dello scaffold in chitosano, con i cristalli di HA che variavano nelle dimensioni (nHA, mHA, HA amorfa) (Figura 3.6). Tutti i modelli hanno una topografia macro-porosa simile a quella del tessuto osseo spugnoso, ma cristallinità, dimensione dei pori e concentrazione giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'adesione cellulare (Figura 3.7).

In particolare la nano concentrazione di idrossiapatite (nHA), se confrontata con una concentrazione di HA amorfa, aumenta notevolmente l'adesione cellulare, perché vi è una dipendenza lineare: una minore concentrazione di HA implica una maggiore adesione cellulare della specie tumorale.

Attraverso la microscopia confocale si è confrontato il nano-modello 3D con il nano-modello 3D ospitante le MSC. In quest'ultimo è stata visualizzata una più accentuata crescita e invasione delle BrCa; le cellule tumorali migrano all'interno dello scaffold con una buona distribuzione nell'intera struttura. È evidente quindi come le MSC svolgano un ruolo importante, consentendo alle cellule tumorali una distribuzione uniforme e un'elevata invasività (Figura 3.8).

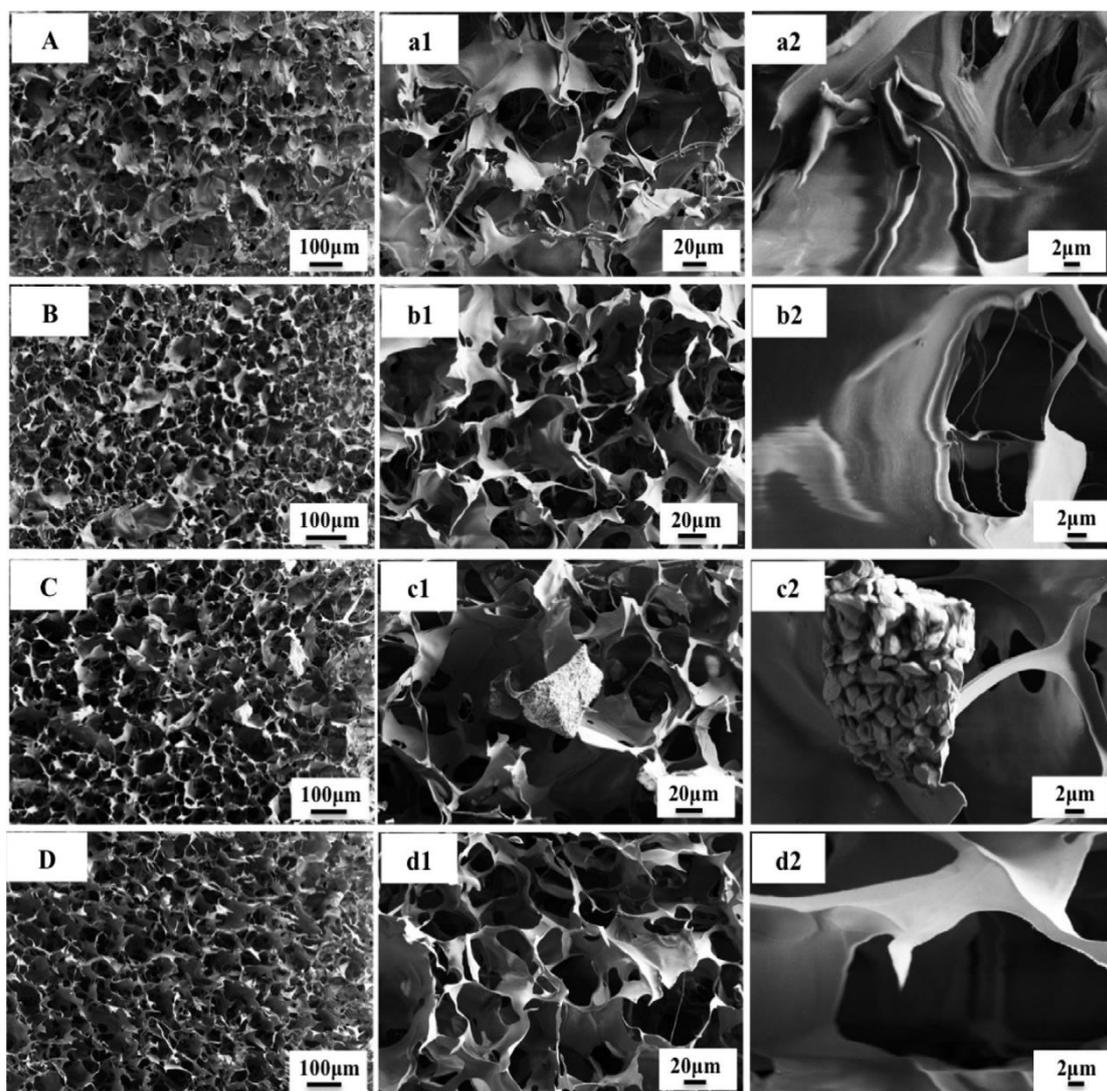


Figura 3.6: Immagine di scaffold del tessuto osseo ottenuti tramite SEM : (A) controllo chitosano; (B) scaffold in chitosano con nHA; (C) scaffold in chitosano con mHA (D) scaffold in chitosano con HA.

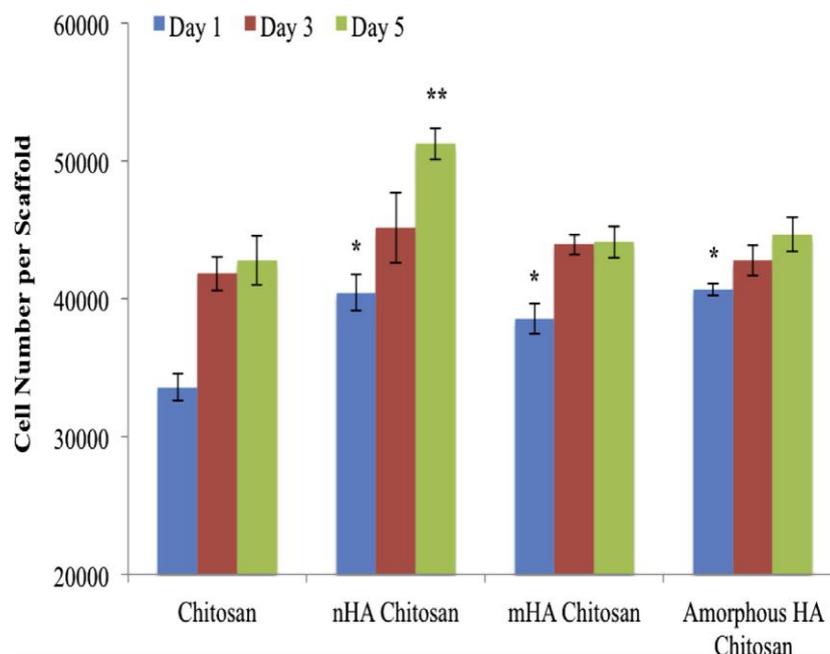


Figura 3.7: Confronto della proliferazione cellulare al variare della porosità e della cristallinità dell'idrossiapatite

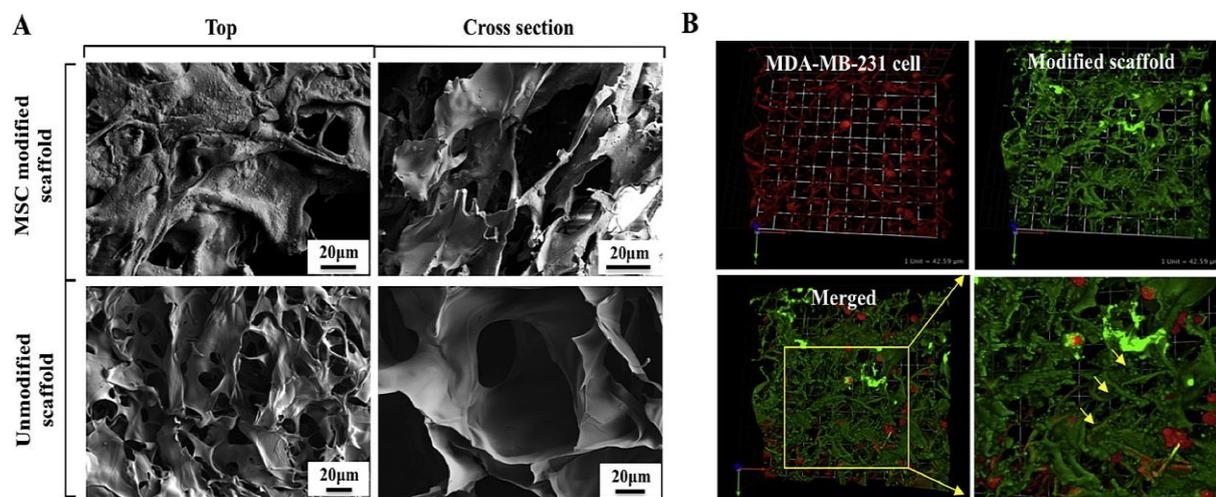


Figura 3.8: Confronto dell'invasività tra scaffold MSC-modificati con il 10% di nHA/chitosano e non modificati con il 10% nHA/chitosano.

In particolare, la linea cellulare MDA-MB-231 migra maggiormente in profondità rispetto alla specie MCF-7. A differenza di un modello bidimensionale, il sistema presentato permette quindi alle cellule BrCa di distribuirsi all'interno di un ambiente tridimensionale, capace di

generare una interazione dinamica tra cellula-cellula (BrCa-MSc e BrCa-BrCa) e tra cellula-matrice (BrCa-ECM). Inoltre, la distinzione della propagazione metastatica delle due specie tumorali è resa possibile grazie all'introduzione delle cellule staminali mesenchimali (Figura 3.9).

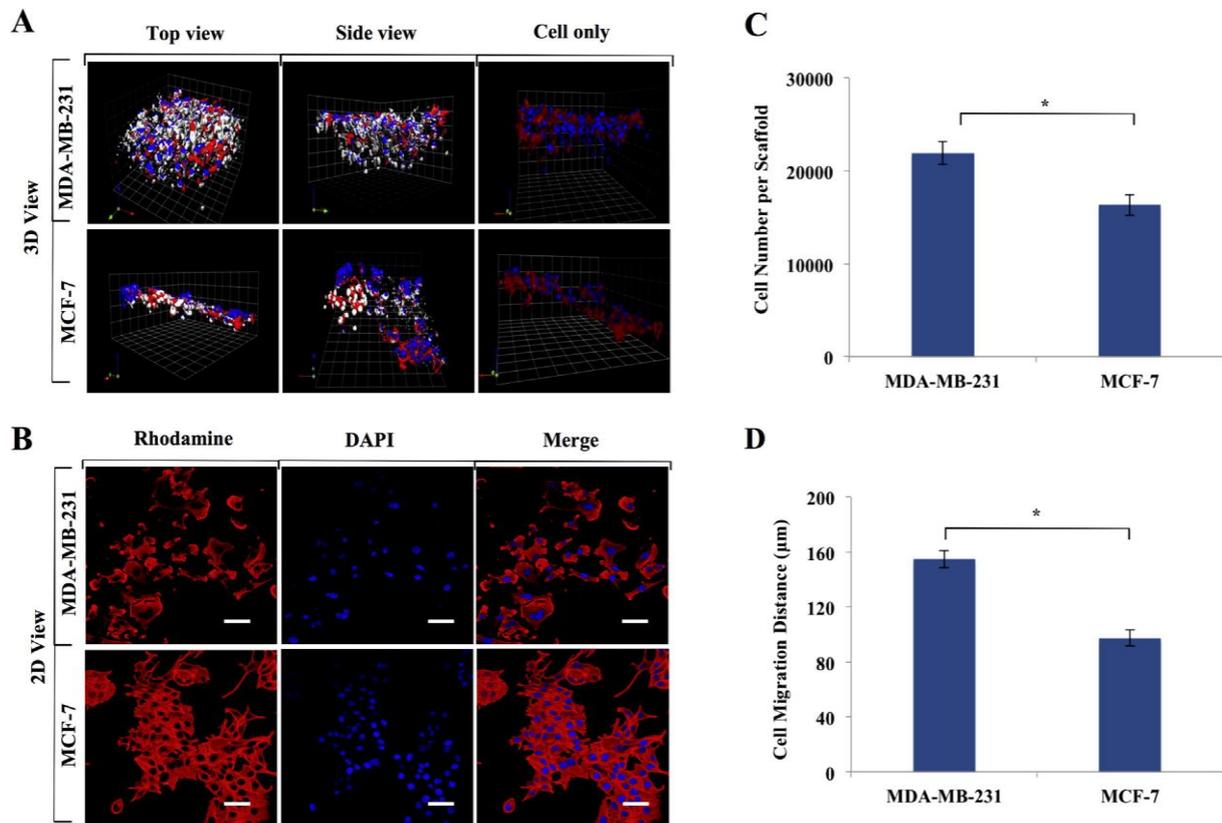


Figura 3.9: Migrazione delle due specie cellulari nel nano-modello osseo modificato (A) confrontate con un sistema di controllo bidimensionale in TCP (B); quantificazione delle cellule cresciute (C) e migrate (D) nel nano-modello tridimensionale in 24h.

E' quindi evidente come il modello nHA/chitosano risulti essere fisiologicamente rilevante e capace di simulare il carattere metastatico delle cellule tumorali mammarie. L'idrossiapatite, essendo una componente primaria della matrice ossea, riveste un ruolo essenziale per l'osteointegrazione delle BrCa, contribuendo notevolmente all'aumento della progressione metastatica. In particolare, la sua dimensione e cristallinità giocano un ruolo critico nella realizzazione di un modello *in vitro* ideale: l'integrazione cellulare aumenta al diminuire della dimensione dei cristalliti e quindi della sua concentrazione. È importante soffermarsi anche sulla funzionalità delle MSCs, ovvero nella sua successiva deposizione di vari fattori

osteogenici, come fattori di crescita, calcio e proteine massimizzando l'imitazione dell'ambiente fisiologico.

W. Zhu et al. 2016 [Wei Zhu et al., 2015], in un lavoro successivo, hanno realizzato una matrice 3D stampata attraverso stereolitografia. Questa ha permesso di valutare l'effetto della geometria sul processo di evoluzione metastatica e della risposta alla chemiosensibilità di alcuni farmaci. In particolare, all'interno di una resina stampata in PEG sono stati aggiunti nano-cristalli di idrossiapatite, prestando attenzione alla geometria utilizzata (Figura 3.10).

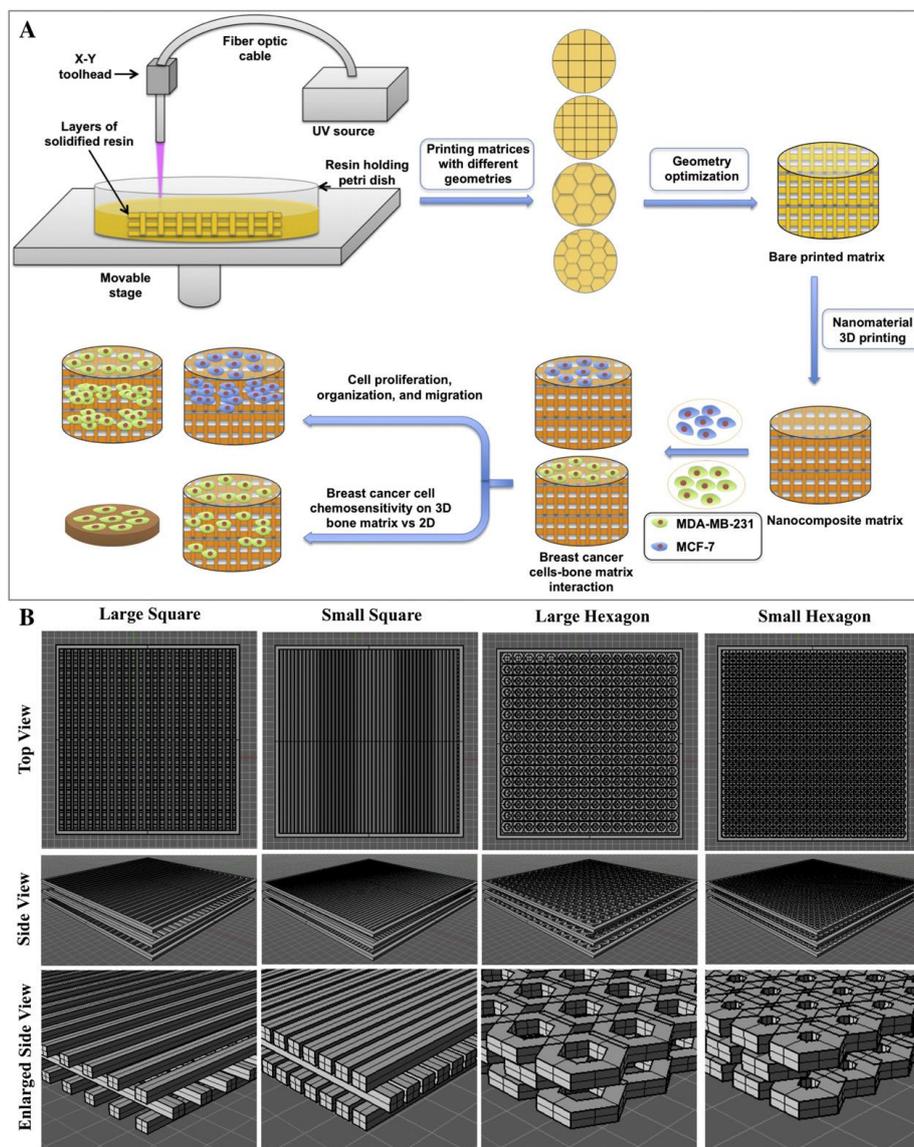


Figura 3.10: Schema di una matrice ossea prodotta con una stampa 3D per valutare l'effetto dell'invasione delle cellule tumorali.

La geometria della matrice in PEG è stata realizzata utilizzando un CAD software, che ha permesso di controllare la porosità in termini di dimensione dei pori e forma delle fibre. La peculiarità di questa metodologia è la possibilità di fabbricare su misura l'intelaiatura dello scaffold, prestando attenzione all'interconnessione dei canali e alla geometria, dando origine a matrici con canali a larga o stretta quadratura e larga o stretta forma esagonale. Ridurre la dimensione da larga (500 μ m) a stretta (200 μ m) comporta un aumento della porosità, che invece tende a diminuire cambiando la forma delle fibre da quadrata ad esagonale. In particolare, la matrice con piccola trama quadrata mostra un'elevata proliferazione cellulare, risultando essere un eccellente esempio di biocompatibilità del tessuto osseo per le cellule cancerogene. Questo è confermato anche in studi precedenti, dove si è riscontrato che la crescita degli osteoblasti e delle cellule del midollo osseo è guidata da un meccanismo di curvatura proprio della geometria dei canali porosi: pori esagonali forniscono un basso rateo di crescita del tessuto rispetto ai pori quadrati, a causa dell'aumento della curvatura [Knychala et al. 2013, Rumpler et al. 2008].

All'interno dello studio, le linee cellulari MDA-MB-231 e MCF-7 sono state testate nel tradizionale ambiente bidimensionale e nella matrice stampata con e senza nHA, per valutare l'efficacia del sistema proposto.

Nella coltura 2D, entrambe le cellule tumorali formano sottili strati con una forte interazione cellula-cellula, mentre nel modello ottenuto con la stampa 3D si formano strutture tridimensionali distinte indipendentemente dall'aggiunta o meno di nano particelle di HA. Questo aspetto indica che non esiste soltanto una forte interazione cellulare, ma anche che una matrice ossea stampata fornisce un ambiente bio-mimetico avente un forte impatto sulla migrazione e sull'interazione cellula-ambiente, portando alla formazione di tumoroidi.

E' quindi ancora una volta evidente che uno scaffold tridimensionale propone un microambiente molto più controllabile rispetto ai supporti bidimensionali per valutare la migrazione e proliferazione tumorale.

Balanchander et al. 2015, hanno proposto un modello tumorale, in cui la linea cellulare MDA-MB-231 è stata coltivata in uno scaffold macroporoso realizzato in poli- ϵ -caprolattone (PCL), un polimero semicristallino sintetico biodegradabile. Questo materiale, anche se non contiene i siti di adesione cellulare, ha il vantaggio di possedere una bassa velocità di degradazione, tale da ridurre l'accumulo dei prodotti acidi di decomposizione. Inoltre, presenta un elevato modulo elastico, minore di quello delle piastre bidimensionali, ma maggiore di quello del tessuto tumorale.

Il PCL è utilizzato nell'ingegneria dei tessuti per la sua biocompatibilità, le sue proprietà meccaniche, strutturali e la sua facilità di lavorazione, tale che dopo opportuni processi tecnologici assume un'architettura ed una rigidità molto simili al tessuto tumorale.

Studi precedenti, infatti, evidenziano come l'invasività delle cellule tumorali sia strettamente correlata con la rigidità del materiale utilizzato [Swaminathan et al.,2011].

Attraverso un opportuno processo di lavorazione, si è ottenuto un modulo elastico con una struttura porosa e una topografia che riproduce verosimilmente la struttura acinata del tessuto mammario presente *in vivo*. Inoltre, l'interconnessione tra i pori è tale da favorire il trasporto dei nutrienti e la migrazione delle cellule attraverso l'interfaccia dello scaffold (Figura 3.11).

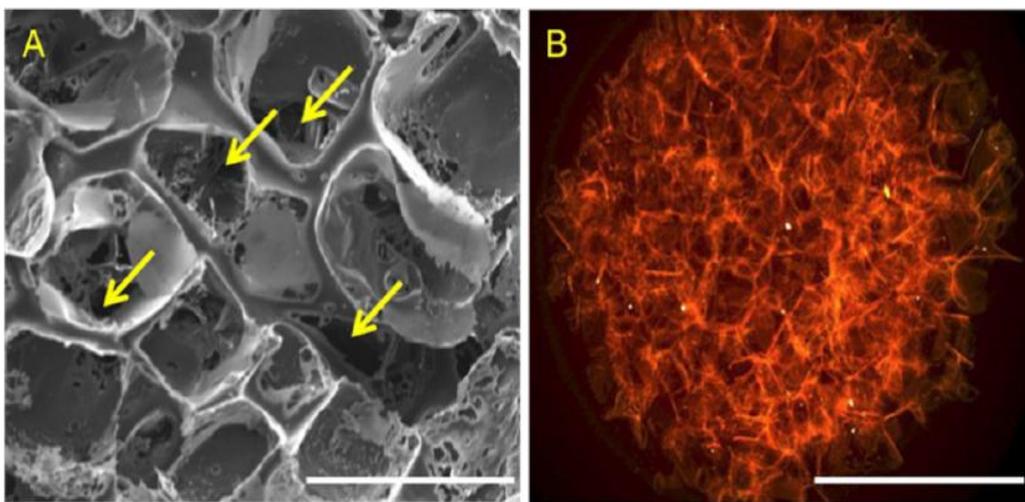


Figura 3.11: 3D PCL scaffolds, evidenziando l'ottima porosità (A) Rappresentazione con miografia SEM, mostrando le interconnessioni tra i pori con una scala di 500 μ m; (B) immagine ottenuta con micro-CT, scala di 3 mm.

Il modulo elastico misurato attraverso un'analisi meccanica-dinamica è risultato essere compreso tra 0.5 e 7 kPa, ovvero: molto più basso del modulo di un comune poliestere (2.79 GPa) utilizzato in coltura bidimensionale, e paragonabile, invece, a quello del tessuto tumorale mammario (4.04 ± 0.93 kPa).

Inoltre, confrontando il PCL con le colture bidimensionale su piastra è stato osservato uno sviluppo di tumoroidi simili alle masse cancerogene *in vivo*, confermando ulteriormente la predisposizione del modello ad una maggiore crescita tumorale (Figura 3.12).

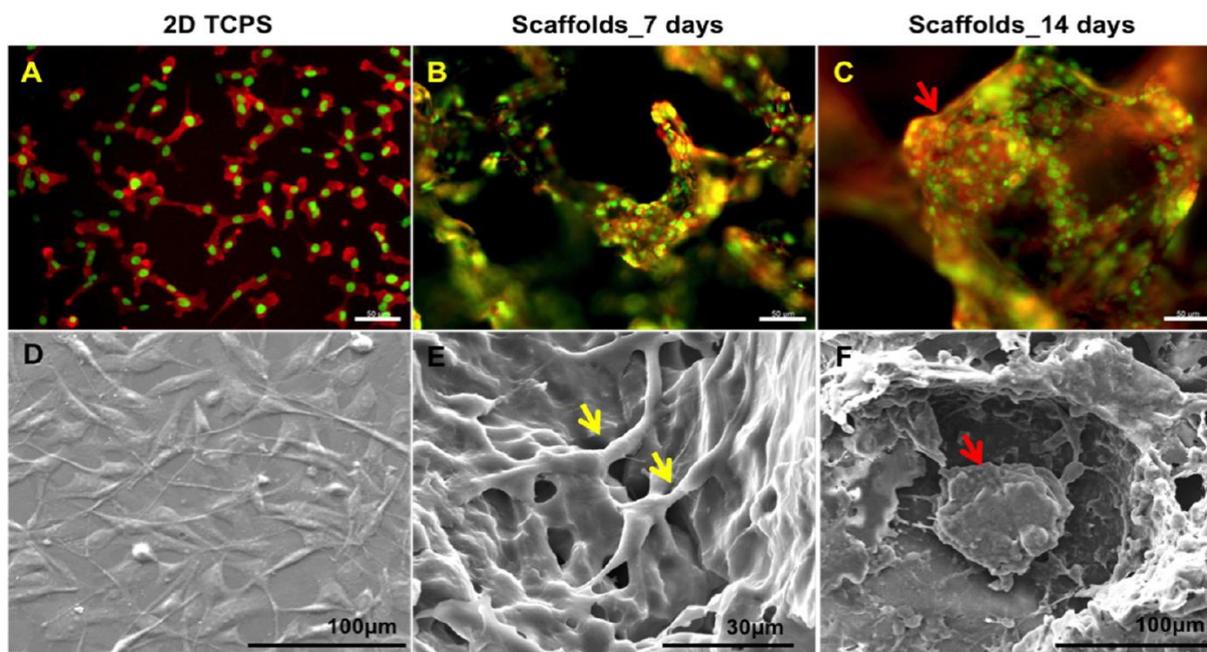


Figura 3.12: (B)(C)(E)(F) crescita delle cellule MDA-MB-231 all'interno di uno scaffold in PCL con conseguente formazione di tumoroidi; (A)(D) crescita cellulare in dischi di TCPS.

L'aumento del potenziale metastatico dipende in particolare da 3 fattori che si verificano nello scaffold:

1. diminuzione della E-Cadherina porta alla perdita delle interconnessioni cellulari;
2. aumento della proteina Twist, importante fattore di trascrizione della transizione mesenchimale;
3. aumento della proteina strutturale Vimentina.

Per comprovare la tumorigenicità ed il potenziale metastatico delle cellule coltivate negli scaffold di PCL, queste ultime sono state prelevate e impiantate nella regione mammaria di un ratto, riscontrando la formazione di un esteso tumore primario e di tessuto osteogenico, il quale risulta essere il precursore della metastasi ossea.

I dati sperimentali hanno confermato che un sistema 3D aumenta l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice, mentre il modulo elastico e l'architettura del substrato (porosità, topografia, grandezza dei pori) influenzano la meccano-trasduzione e la potenzialità di generare un neoplasma.

In generale, nonostante i vantaggi delle colture 3D rispetto alle colture bidimensionali tradizionali, rimangono ancora alcuni “ostacoli” da superare come l’assenza dell’interfaccia tessuto-tessuto, degli stimoli biomeccanici, della distribuzione spazio-temporale di ossigeno, nutrienti e rifiuti metabolici, normalmente presenti *in vivo* [Duval et al. 2017]. Questi limiti possono essere superati attraverso l’utilizzo di dispositivi per coltura dinamica, ovvero, i bioreattori.

Capitolo 4

COLTURA CELLULARE DINAMICA

4.1 INTRODUZIONE

La principale differenza tra eseguire studi su colture cellulari mantenute *in vitro* o *in vivo*, è dettata dalle diverse condizioni ambientali a cui le cellule sono sottoposte.

Un esempio rilevante è l'ineguale concentrazione di nutrienti a cui esse sono esposte: in un sistema 2D o 3D *in vitro*, e in assenza di una adeguata dinamica, si ha una disomogenea distribuzione. Questo è ovviamente del tutto differente da ciò che accade *in vivo* dove la quantità/distribuzione di fattori solubili è caratterizzata da gradienti spaziali che rivestono un ruolo importante durante la proliferazione, il differenziamento, e lo sviluppo del tessuto.

L'estrazione di cellule dall'ambiente fisiologico nativo ed il loro successivo collocamento in un sistema di coltura *in vitro*, portano ad una risposta adattiva indicata come “*culture shock*”, il cui effetto e durata dipendono dalla stabilità del microambiente ospite, ovvero dalla sua capacità di simulare le condizioni *in vivo* e di interagirvi attivamente.

Per molto tempo si è pensato che questo fenomeno e i danni accumulati durante la coltura cellulare siano stati dei limiti per un'adeguata caratterizzazione *in vitro*. Ne consegue che uno dei principali obiettivi che si pone l'ingegneria tissutale, è la realizzazione di dispositivi tali da riprodurre le svariate condizioni biochimiche e biomeccaniche presenti *in vivo*.

Analizzando il processo metastatico, si evince come molti fenomeni cellulari come l'organizzazione strutturale del tessuto, la motilità, e proliferazione cellulare, siano regolati dalle interazioni con l'ambiente circostante. In particolare, in un approccio convenzionale, la crescita cellulare e la concentrazione di nutrienti tendono ad impoverirsi, i prodotti di scarto ad aumentare e il pH decresce verso livelli inaccettabili, portando a parametri di coltura che tendono a discostarsi dai loro valori ottimali.

Il tessuto osseo, a causa della sua diretta inaccessibilità, risulta essere difficile da studiare *in vivo*. Si necessita, quindi, di un modello *in vitro* tale da garantire la fisiopatologia della metastasi

ossea e la conseguente analisi dell'interazione tra l'ambiente ospite e la cellula neoplastica, ricreando l'architettura tridimensionale del tessuto in esame.

Considerando lo sviluppo del tessuto osseo *in vitro*, è possibile notare come la rimozione continua o periodica del mezzo di coltura implichi che le reazioni mediate da cellule e proteine inducono, allo stesso modo, ad una perturbazione della mineralizzazione e del riassorbimento osseo.

Tali limiti possono essere risolti attraverso l'impiego di dispositivi di coltura cellulare dinamiche, ovvero, i bioreattori. Questi, permettono di ricreare condizioni biochimiche e biomeccaniche quanto più simili all'ambiente *in vivo*. Ad esempio, l'applicazione di una perfusione consente di ottenere una diffusione attiva dei nutrienti e delle sostanze di scarto, garantendo concentrazioni fisiologiche.

I bioreattori permettono quindi di migliorare i processi di proliferazione, differenziamento e formazione di nuova ECM, prolungando inoltre il tempo di coltura cellulare senza che vi siano perturbazioni dall'esterno.

I modelli di coltura tridimensionale in ambiente dinamico portano a numerosi vantaggi rispetto ai metodi preesistenti, come l'aumento della riproducibilità, il preciso controllo sulle condizioni di coltura e l'incorporazione delle linee cellulari tumorali, portando ad un'analisi più sistematica e quantitativa rispetto i modelli *in vivo*.

I principali punti di forza di un modello tridimensionale dinamico sono quindi:

- Il sostentamento continuo del terreno di coltura;
- La rimozione dei prodotti di scarto metabolico;
- La perfusione di ampi volumi cellulari;
- Il monitoraggio in tempi reali delle interazioni dinamiche cellula-cellula e cellula-matrice;
- L'efficiente scambio di citochine e fattori di crescita;
- La produzione di una matrice extra-cellulare che necessita della presenza di uno scaffold per garantire la stabilità meccanica e per la regolazione delle funzionalità cellulari;
- Una accurata, rapida, non costosa valutazione dell'efficacia e della tossicità delle terapie utilizzate per il trattamento di neoplasie.

Quando elencato consente quindi di riprodurre accuratamente *in vitro* la microfisiologia dei tessuti tumorali, con il fine ultimo di ottenere uno studio farmacologico più accurato.

4.2 EFFETTO DELLA COLTURA DINAMICA SU MODELLI TUMORALI

L'evoluzione della metastasi ossea è stata definita come un processo dinamico multi-step e per questo motivo risulta necessario avere una comprensione ottimale della dinamica del sistema ospite.

La dinamica ossea, ad oggi, è un aspetto complesso e non è del tutto chiaro l'effetto della sollecitazione meccanica nello sviluppo e nella progressione della metastasi mammaria, caratterizzata dalla degradazione della matrice ossea derivante dall'aumento dell'attività osteoclastica e con il conseguente sviluppo di “*eventi correlati*”.

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale ricopre particolare interesse, poiché ottenere dettagliate informazioni sul sistema osseo potrebbe delucidare i meccanismi che inducono alla mecano-trasduzione. Inoltre, dispositivi che inducano la sollecitazione meccanica del tessuto sono necessari per capire i fattori coinvolti durante il formarsi delle lesioni ossee.

Fritton et al. 2005, hanno realizzato un attuatore elettromagnetico utile ad applicare una compressione ciclica sull'estremità della tibia di un ratto. In particolare, hanno ipotizzato che il volume di tessuto mineralizzato aumenti sia nella regione corticale sia nella regione trabecolare, e che questo incremento dipenda da carichi ciclici assiali applicati alla tibia di ratto. Attraverso, la micro-tomografia computerizzata (μ CT) è quindi stata valutata la quantità minerale depositata o riassorbita, dopo due e sei settimane. Ne è risultato un aumento dello spessore trabecolare e del volume totale dopo 6 settimane. Questo incremento è il risultato dell'aumento dell'attività osteoblastica e/o della riduzione di quella osteoclastica.

Dhurjati et al. 2006, hanno sviluppato un *bioreattore compartimentato*, utile per lo studio dell'osteogenesi e dell'osteopatologia *in vitro*. La perdita dell'integrità cellulare propria della coltura tradizionale, ha spinto verso la realizzazione di un dispositivo capace di sostenere le cellule per più di 30 giorni senza interventi esterni, permettendo un contatto a lungo termine tra osteoblasti e osteoclasti. Il bioreattore compartimentato separa la regione di crescita cellulare (Figura 4.1 (A)) dal serbatoio del mezzo di cultura (Figura 4.1 (B)) attraverso una membrana per dialisi (Figura 4.1(C)). Le cellule sono coltivate su un film trasparente e impermeabile ai liquidi (Figura 4.1(E)), scelto per la citocompatibilità e per la permeabilità a gas come ossigeno ed anidride carbonica. Durante la coltura le cellule sono continuamente bagnate da un mezzo ossigenato e con pH equilibrato, mentre i prodotti metabolici di scarto, come l'acido lattico, sono dializzati dalla camera di crescita cellulare. La sostituzione del terreno può essere

effettuata in un tempo che varia dai 15 ai 45 giorni. Il corpo del dispositivo consiste in 4 anelli principali (Figura 4.1 (C:F,G,H,I)) che formano due camere separate da 3 films (Figura 4.1 (C,D,F)) inseriti tra due anelli interni (Figura 4.1 (F,G)). L'intero dispositivo è tenuto insieme con 6 viti in acciaio inossidabile (Figura 4.1 (B)), mentre l'accesso al serbatoio e alla camera di crescita è reso possibile da porte luer-taper (Figura 4.1(J,K)).

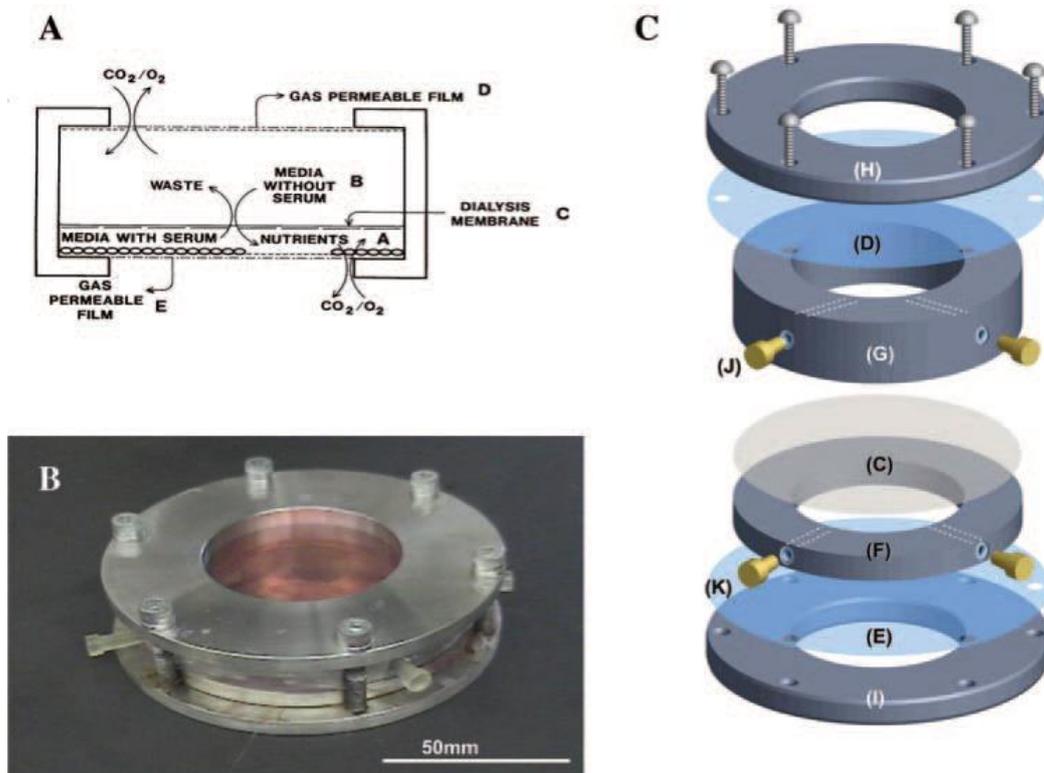


Figura 4.1: *Struttura di un bioreattore compartimentato.*(A) *sezione trasversale del dispositivo che mostra la separazione attraverso una membrana di dialisi dello spazio di crescita cellulare dalla sorgente del mezzo di coltura. Le cellule crescono su un film permeabile al gas e non permeabile al liquido (E). Il dispositivo è ventilato attraverso il film (D), mentre è tenuto insieme da 6 viti in acciaio inossidabile (B) e l'accesso ai liquidi è reso possibile da porte luer-taper che si accoppiano alla pipetta standard (J,K).*

Un modello di metastasi ossea da tumore alla mammella è stato coltivato all'interno del dispositivo.

Le linee cellulari MC3T3-E1 e hFOB1.19, sono state coltivate rispettivamente per 120 e 30 giorni, al fine di realizzare il tessuto osseo ospitante. La coltura dinamica è stata confrontata

con la coltura tradizionale. I risultati mostrano che sia in condizioni tradizionali che all'interno del bioreattore la proliferazione è quasi identica. Nel primo caso però, le cellule sono impacchettate in meno strati e appaiono più sottili. Inoltre, dopo 30 giorni si verifica una perdita della ECM e l'apoptosi. Nel secondo caso, è stata osservata la formazione di tessuto osteoblastico (OT) composto da 6-8 strati cellulari, nonché la trasformazione della struttura osteoblastica da piatta a cuboidale, con una corrispondente secrezione e mineralizzazione di un'estesa matrice extracellulare ricca di collagene.

Successivamente le cellule tumorali da carcinoma alla mammella (BCs) sono state inserite all'interno delle rispettive colture cellulari. Attraverso la microscopia a fluorescenza è stata monitorata l'interazione tra le BCs e il tessuto osteoblastico. Le cellule tumorali aderiscono entro le prime 24 ore dalla semina, e dopo 3 giorni si riscontra una loro proliferazione e protusione allungata arricchita da filamenti di actina e formano catene cellulari simili a "file indiane". Questa è una caratteristica propria della metastasi da carcinoma mammario (Figura 4.2). L'organizzazione in catene di cellule tumorali è un parametro di grande importanza che enfatizza il meccanismo di penetrazione conferendo un'alta capacità metastatica. L'esposizione del OT alle BCs induce ad una riorganizzazione citoscheletrica in risposta ad alcuni fattori secreti dalla linea metastatica, come la riorganizzazione delle fibre di actina. Inoltre, gli osteoblasti assumono una forma allungata e si allineano parallelamente con le cellule cancerogene. Questi cambiamenti sono concordi con le osservazioni sperimentali, ovvero che un OT esposto alla metastasi risulta essere molto più fragile di un tessuto sano, e che l'interazione è influenzata dalla maturità osteoblastica: le cellule metastatiche non riescono a penetrare osteoblasti immaturi. L'introduzione delle BCs riduce la produzione di nuovo collagene ed osteocalcina, si hanno cambiamenti nei prodotti secreti dalla ECM e nella mineralizzazione, ed è presente una risposta infiammatoria che riveste un ruolo critico nella perdita ossea, ovvero, le citochine attaccano il tessuto attivando gli osteoclasti. Tutte queste osservazioni suggeriscono che il normale funzionamento osteoblastico (deposizione e mineralizzazione della matrice) non solo viene indebolito dalla presenza della BCs, ma il OT è degradato dall'invasione tumorale, producendo una risposta infiammatoria cooperando con gli stessi osteoblasti [Dhurjati et al. 2008].

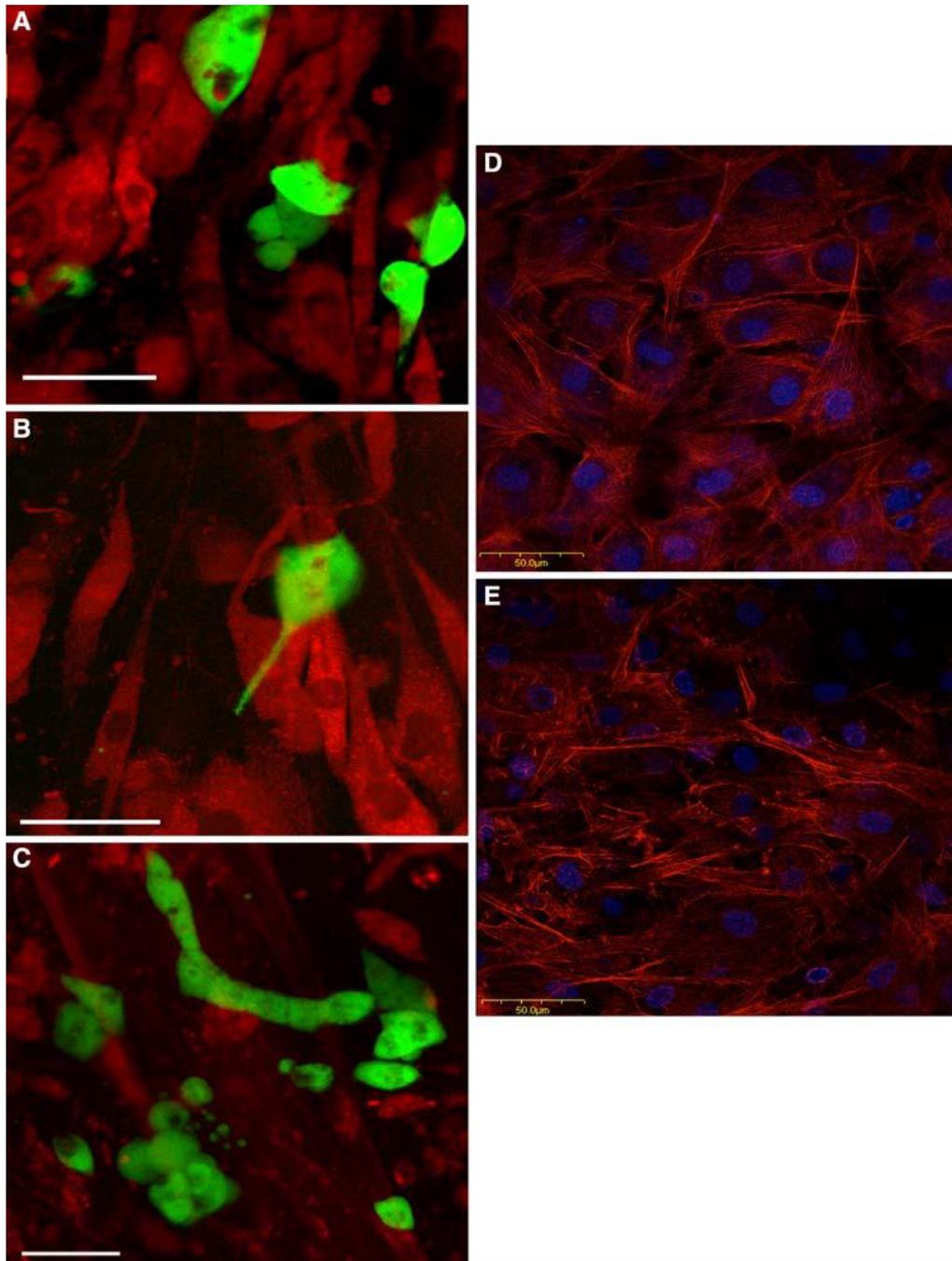


Figura 4.2 : *MDA-MB-231* cellula del carcinoma mammario invade *MC3T3-E1* derivante dal *OT* cresciuto per 5 mesi nel bioreattore compartimentato. *OT* è stato coltivato con le *BCs*, e immagini confocali sono state ottenute ogni 3 giorni: adesione(A), penetrazione (B), organizzazione nel modello caratteristico (C), macchie di folidina dopo 16 giorni di coltura nel bioreattore(D) sono confrontate con un tessuto simile esposto alla *MDA-MB-231* per 2 settimane (E).

I test eseguiti sul dispositivo hanno dimostrato che un tessuto coltivato all'interno di un bioreattore basato sul principio della simultanea crescita e dialisi, può crescere ed essere mantenuto in coltura per lungo tempo (>120 giorni). Vi è quindi una maggiore efficacia rispetto ad una coltura tradizionale, dove il mezzo di coltura cambiato ogni 3 giorni, porta all'effetto ad "culture shock" con conseguente instabilità, apoptosi, perdita di ECM.

Krishnan et al. 2011 riprendono il lavoro di Dhurjati, confermando come all'interno del bioreattore la co-coltura di un tessuto osteoblastico maturo con cellule tumorali, permette la penetrazione nel tessuto di queste ultime ed il loro allineamento, causando un cambiamento morfologico degli osteoblasti.

In particolare, confrontando la coltura dinamica con quella tradizionale, durante i primi 20 giorni di coltura si ottiene la stessa espressione genica. Dal ventunesimo al sessantesimo giorno, invece, in coltura dinamica si è osservata l'espressione di proteine associate al processo di mineralizzazione OCN, OSN, collagene di tipo I; un aumento è stato osservato nell'espressione dell'OPN, glicoproteina acida che media l'attaccamento cellulare, e nella concentrazione del MMP-13, un marcatore che indica il ricambio della ECM prodotta dagli osteoblasti. Il collagene di tipo I, una delle più abbondanti proteine della matrice ossea, appare all'inizio del processo di differenziamento; l'OCN è un indicatore degli osteoblasti maturi e si sviluppa dal ventunesimo giorno di coltura nel bioreattore; l'OSN esprime i siti di legame del calcio e si associa al collagene ed è presente in entrambe le colture. Immagini ricavate con la TEM mostrano che gli osteoblasti cresciuti nel bioreattore sono completamente inglobati nella ECM, e che la loro progressione e maturazione ricapitola lo sviluppo *in vivo*. In entrambe le colture si ha una sovraregolazione della citochina IL-6 ed una diminuzione della OCN che implica una perdita della funzionalità osteoblastica. Gli osteoblasti immaturi hanno una risposta infiammatoria minore rispetto a quelli maturi, inoltre le condizioni fisiche, chimiche e biologiche delle cellule meno mature potrebbero essere più conduttive per la crescita tumorale. Numerosi studi indicano l'importanza dell'adesione cellulare, della rigidità e degradazione della matrice nel processo metastatico. I risultati chiave come le singole file cellulari, il cambiamento della morfologia osteoblastica, l'allineamento delle cellule tumorali sullo stesso asse dell'orientamento osteoblastico, la possibile formazione di invadopodia, sono aspetti visibili soltanto nella coltura dinamica.

L'introduzione delle MDA-MB-231 nella co-coltura osteoblastica/osteoclastica ha creato un sistema di tri-coltura composto dai principali attori cellulari del "metastatic vicious cycle" (Figura 4.3) [Krishnan et al., 2014].

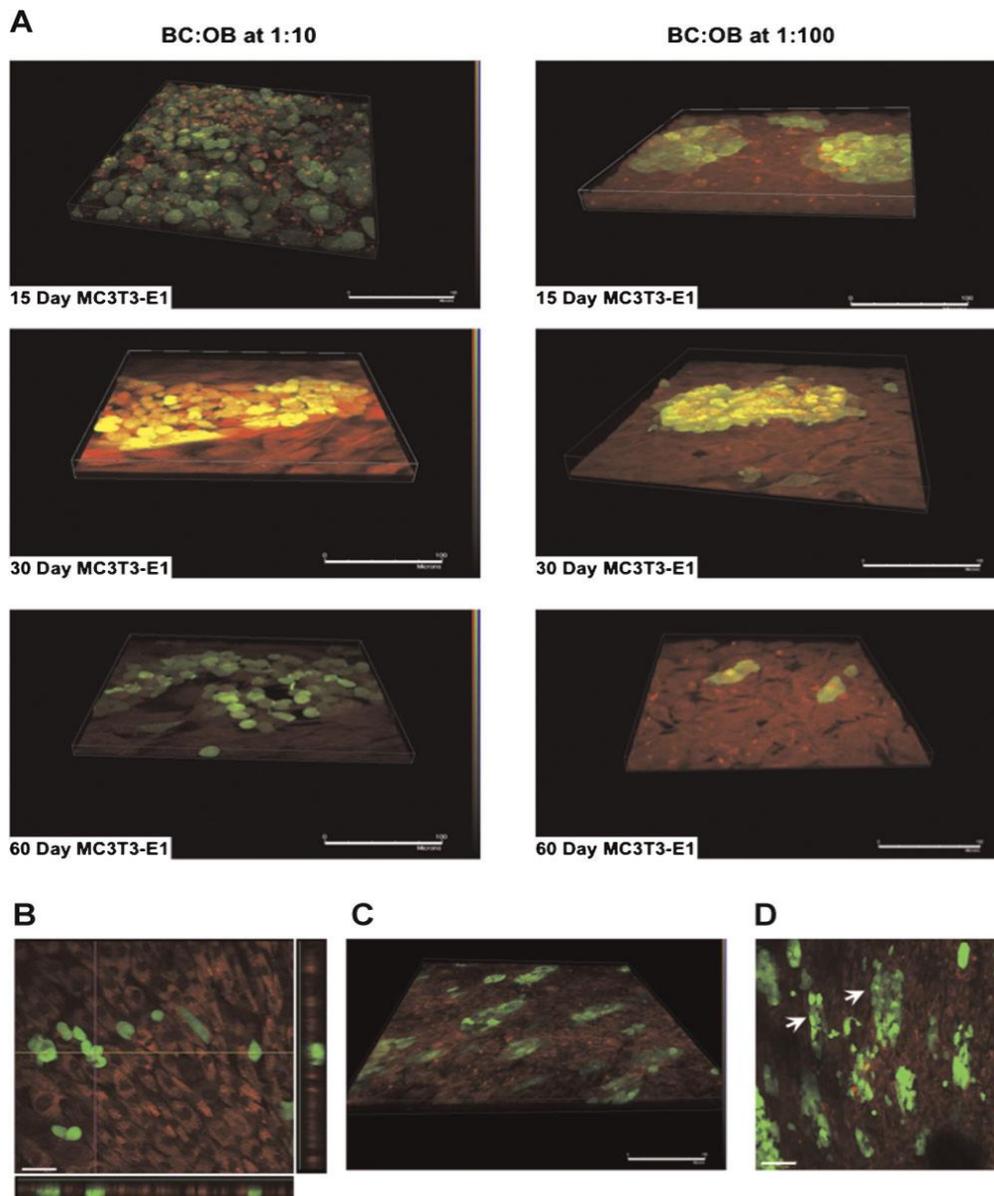


Figura 4.3: Co-cultura tridimensionale della cellula metastatica umana MDA-MB-231 del tumore alla mammella con il tessuto osteoblastico MC3T3-E1. (A) MC3T3-E1 in tre fasi di co-cultura diverse (15,30,60 giorni) con MDA-MB-231. Le immagini sono ottenute con la microscopia confocale, sono mostrate immagini tridimensionali ricoperte di z-stacks, a 15 giorni spessore di 20 μm , a 30 giorni uno spessore di 15 μm , a 60 giorni uno spessore di 14 μm .(B)La penetrazione delle cellule tumorali(verde) nel tessuto osteoblastico(rosso) visto dal piano trasversale xx e xy. (C) Ricostruzione 3D/ visualizzazione dell'allineamento delle cellule tumorali lungo l'asse di orientamento osteoblastico.(D) Gli osteoblasti assumono una forma allungata e le cellule tumorali si allineano lungo gli osteoblasti; le frecce indicano l'organizzazione in singole file.

In particolare, si è osservato che la cellula neoplastica attacca il tessuto osteoblastico proliferando e formando colonne cellulari che penetrano il tessuto già dopo 3 giorni di coltura, in assenza di osteoclasti. Questo fenomeno è stato già descritto da Mundy et al. nel 1981: la linea tumorale quando colonizza il midollo osseo, è attratta dalla superficie a causa dei prodotti

derivanti dal riassorbimento osseo, e successivamente proliferando distrugge il tessuto attraverso la stimolazione degli osteoclasti.

Lynch et al. 2013, hanno realizzato un dispositivo per la compressione tibiale al fine di indagare il ruolo degli stimoli meccanici nello sviluppo e nell'osteolisi del microambiente tumorale secondario. In particolare, lo studio è stato concentrato sull'effetto integrato della sollecitazione meccanica e della linea tumorale mammaria sul rimodellamento osseo. A tale scopo la linea cellulare MDA-MB-231 è stata iniettata all'interno della tibia di un ratto e successivamente è stata applicata una compressione tibiale. Attraverso la μ CT si è osservato cosa è avvenuto a livello istologico: in tutte le tibie prossimali non caricate si sono sviluppati tumori (già dopo 2 settimane) con conseguente degradazione ossea dopo 6 settimane; nella tibia caricata, invece, si ha una riduzione della progressione tumorale e della degradazione ossea. In assenza di carico si è constatato, quindi, la formazione di tumori e la rispettiva osteolisi e degradazione del tessuto osseo prossimale, mentre la sollecitazione meccanica riduce drasticamente questi fattori ed incrementa lo spessore trabecolare. Il modello suggerisce che gli effetti della sollecitazione meccanica osservati non causano morte cellulare, piuttosto diminuiscono l'espressione di geni che interferiscono l'omeostasi ossea. Si è osservato che dopo 6 settimane il tumore si è diffuso solo nel 29% degli animali sollecitati meccanicamente, a differenza del 100% degli animali non sollecitati.

Una possibile spiegazione a questi eventi è che la compressione tibiale porta ad un'elevata copertura tissutale da parte degli osteoblasti attivi e alla successiva formazione di matrice ossea. Questa va a contrastare l'osteoclastogenesi mediata dal tumore e a diminuire il rilascio dei fattori di crescita. La sollecitazione, quindi, non ha un effetto diretto sulla crescita o morte cellulare, ma altera l'espressione dei morfogeni che possono modulare le funzioni osteoclastiche ed osteoblastiche.

Marshall et al. 2017 hanno realizzato un *bioreattore a perfusione* per supportare la vitalità delle cellule del carcinoma alla mammella, in un sistema tridimensionale *in vitro* con un volume cellulare fisiologicamente rilevante (1.2 cm^3), permettendo una coltura a lungo termine. La sua caratteristica essenziale è di avere un volume tridimensionale che risulta essere il più ampio tra i sistemi microfluidodinamici, dando origine ad una realistica geometria tumorale. La struttura tridimensionale è realizzata da una matrice extracellulare costituita da collagene bovino di tipo I e da fattori di crescita contenuti nel Matrigel, in modo tale da imitare la ECM presente nel microambiente del tumore alla mammella. La struttura presenta però una bassa viscosità, per cui è stata arricchita con uno scaffold di supporto realizzato in una nano-

schiuma di carbonio, che si contraddistingue per la sua elevata rigidità e porosità (Figura 4.4(A)).

Lo spessore della struttura tridimensionale è maggiore della capacità di diffusione di ossigeno e nutrienti. Per ovviare a tale problema, sono stati quindi realizzati dei micro-canali che aumentassero gli scambi diffusivi. I micro-canali sono realizzati in Teflon rivestito in acciaio inossidabile ed attraversano la nano-spugna di carbonio (Figura 4.4(B)). Il collagene è stato invece utilizzato per garantire un buon bilancio tra la rigidità della matrice, necessaria a resistere alla pressione del flusso, e la capacità delle cellule di migrare attraverso i pori della ECM. In particolare il bioreattore è stato realizzato in modo tale che la polimerizzazione della ECM in idrogel avvenga nello stesso dispositivo evitando contaminazioni esterne. È possibile suddividere l'intera struttura in tre parti principali: una porta di ingresso per il fluido, una porta di uscita per il fluido, una camera di flusso realizzata in polidimetilsilossano (PDMS) che funge da ponte tra le due estremità in cui risiede lo scaffold (Figura 4.4(C)).

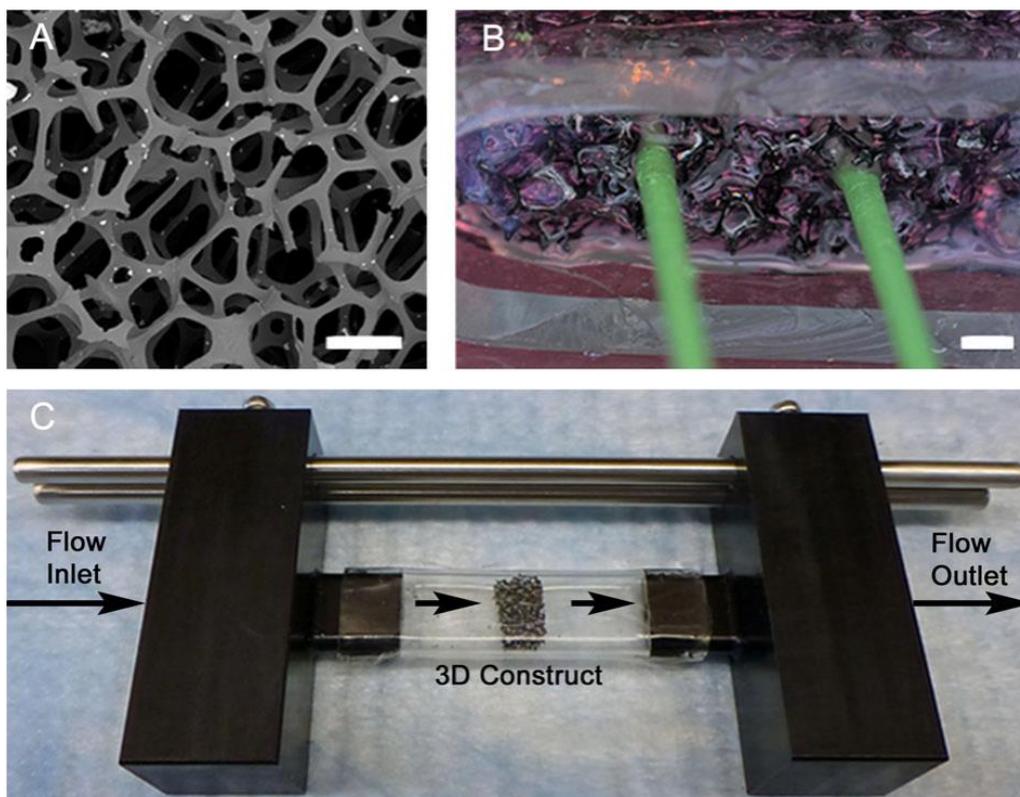


Figura 4.4: La struttura tumorale è supportata dalla nano-spugna in carbonio, da micro-canali e da un bioreattore con flusso di perfusione. (A) porosità del carbonio e deposizione dell'ossigeno; (B) micro-canali che attraversano lo scaffold in nano-spugna di carbonio e la ECM; (C) bioreattore con flusso di perfusione avente una camera di flusso come ponte tra la porta d'ingresso e di uscita del fluido.

La linea cellulare MDA-MB-231 e i fibroblasti derivati da tessuto di mammella sana sono seminati all'interno della ECM in idrogel e monitorati per tutto il tempo di coltura. I risultati

ottenuti mostrano un incremento dello stroma delle cellule tumorali che potrebbe rivestire un ruolo fondamentale nella progressione tumorale. In particolare, nella figura 4.5 è possibile osservare la differenza tra la coltura 3D dinamica e la coltura tradizionale 2D. In particolare, quest'ultima necessita di una sostituzione del terreno di coltura ogni 3 giorni per evitare alterazioni del pH, e presenta una diffusione passiva che comporta la mancata eliminazione dei prodotti di scarto metabolico, i quali contribuiscono al decremento della vitalità cellulare. La presenza dei micro-canali e della perfusione costante della ECM sono quindi requisiti importanti per la vitalità cellulare e per la proliferazione in scaffold con volumi rilevanti.

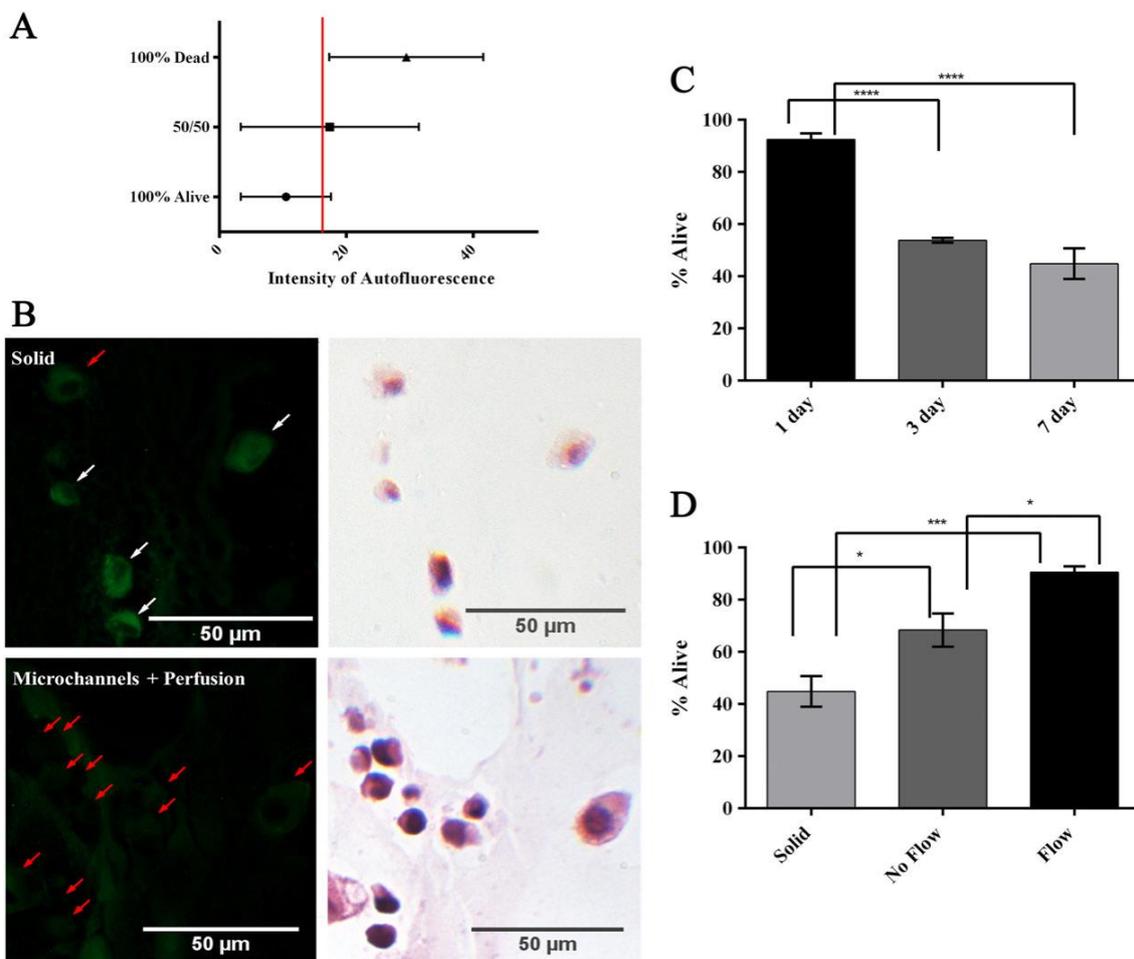


Figura 4.5: La vitalità cellulare aumenta nel bioreattore rispetto ad una preparazione solida. (A) l'intensità autofluorescente mostra le cellule morte, la linea rossa verticale è la massima intensità con cui si ha il distacco tra le cellule vive e morte; (B) Immagine istologica del preparato solido e del sistema con il bioreattore: a sinistra si ha un'immagine ottenuta con la microscopia fluorescente, dove le frecce rosse indicano le cellule vive, mentre le bianche le cellule morte, a destra un'immagine rilevata con una microscopia a campo chiaro; (C) grafico in cui sono riportate le concentrazioni cellulari viventi nel giorno 1, 3 e 7, in una struttura solida; (D) grafico in cui sono riportate le concentrazioni cellulari viventi in una struttura solida, in assenza di flusso e in presenza di flusso.

Cavo et al. 2018, hanno utilizzato un innovativo *bioreattore multi-organo in vitro* (MIVO) realizzato recentemente dalla React4life Srl [www.react4life.com]. Il dispositivo consiste di una camera di coltura cellulare usa e getta capace di ospitare un tessuto vivente sotto determinate condizioni fisiologiche (Figura 4.6).

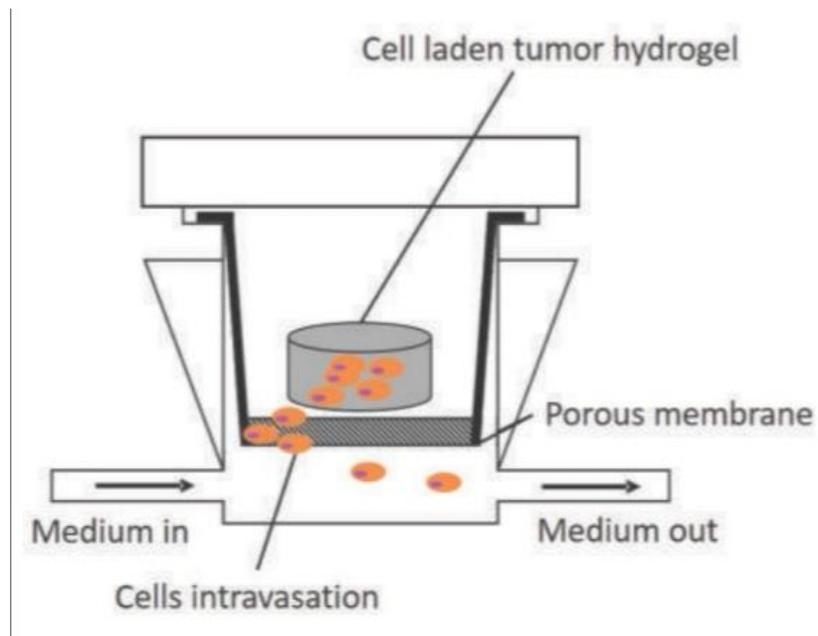


Figura 4.6: Schema del bioreattore MIVO

L'unione della micro-fluidodinamica e della coltura di un tessuto vivente, rendono MIVO una piattaforma utile per lo studio dei processi di interfacciamento. Al suo interno, l'utilizzo di transwell cellularizzati permettono di ottenere facilmente le interfacce aria-liquido o liquido-liquido. L'approccio utilizzato nel settore oncologico è di *doppia circolazione* (Figura 4.7), ovvero, il fluido lambisce sia la camera superiore che quella inferiore; differenti parametri di coltura come pH, concentrazioni metaboliche, velocità di flusso, possono essere gestiti.

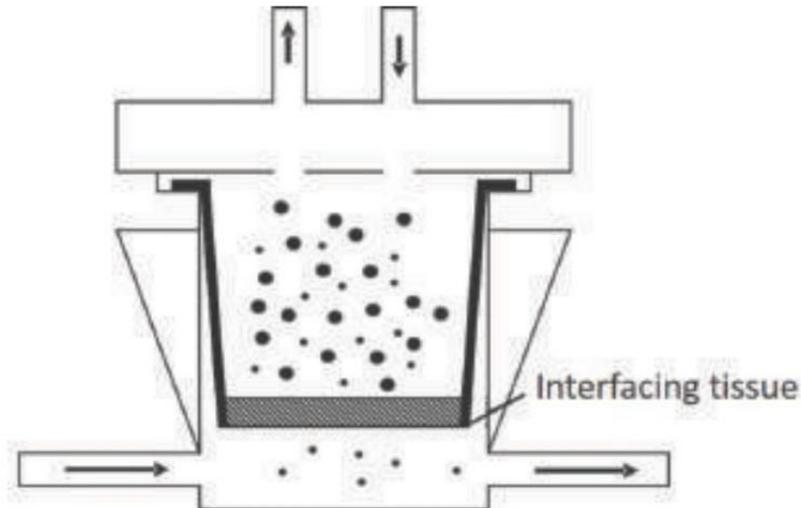


Figura 4.7: Metodologia utilizzata nel settore oncologico.

Il sistema permette di ospitare e coltivare un tessuto epiteliale nella membrana artificiale del transwell. Questo svolge la funzione di parete vascolare, per ricreare artificialmente i fenomeni della migrazione cellulare, della diffusione di molecole e dell'assorbimento di nutrienti, utili ad ottenere un modello più simile al tessuto *in vivo*, ovvero, a studiare la metastasi tumorale e la validazione di nuove terapie anti-tumorali.

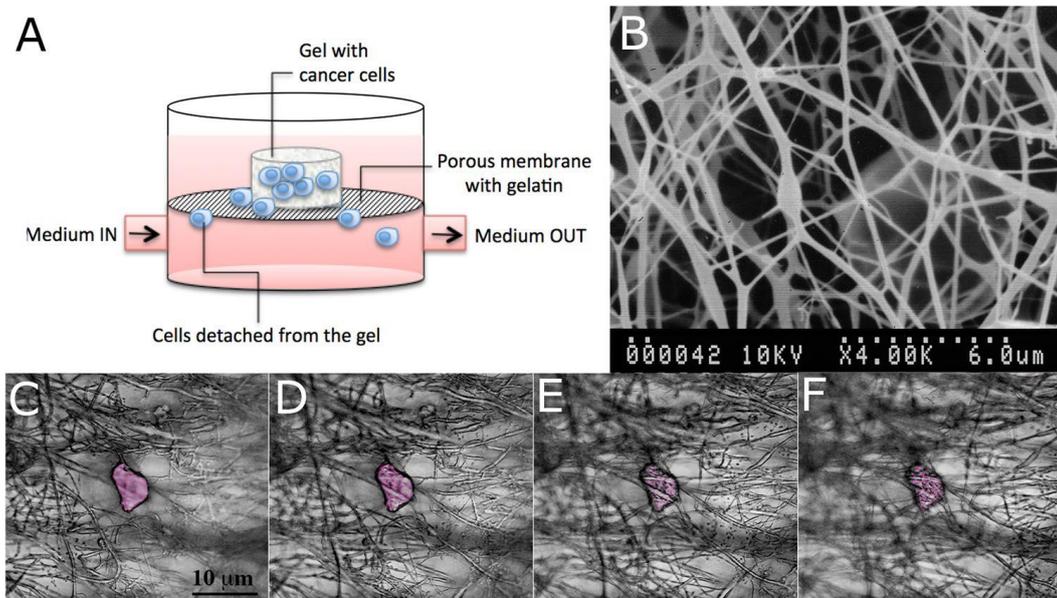


Figura 4.8: Fasi preliminari della metastasi nel bioreattore. (A) Schematica rappresentazione del set up per l'osservazione della diffusione e intravasazione cellulare. Il bioreattore è stato sviluppato da React4life S.r.l. (B) Membrana elettrospugnosa usata per simulare l'interfaccia con i vasi sanguigni, realizzata in PCL. (C-F) Immagini confocali che mostrano come la cellula viene intrappolata nella membrana.

In questo studio (Figura 4.8) si è voluto compiere un passo avanti nello sviluppo di modelli per il tumore alla mammella, proponendo un nuovo sistema per una neoplasia ad alta invasività. Da questa idea nasce l'esigenza di realizzare un biomateriale composito che possa sostenere, nel miglior modo possibile, la coltivazione della linea tumorale MDA-MB-231.

È stato quindi sviluppato un gel composto da Alginato e Matrigel per ottenere una struttura stabile nel tempo ed un substrato biologicamente attivo, portando al raggiungimento di 3 risultati significativi:

1. le cellule hanno una peculiare forma citoscheletrica ed una frammentazione nucleare caratteristica della loro malignità;
2. le cellule esprimono l'invadopodia, ovvero una protusione a base di actina con cui ancorano e distruggono la ECM;
3. le cellule migrano attraverso il gel ed attaccano la membrana vascolare ingegnerizzata nel bioreattore, ottenendo un nuovo modello 3D *in vitro*, che funge da precursore delle fasi metastatiche.

L'alginato risulta essere un ottimo candidato per la realizzazione di strutture tridimensionali stabili nel tempo, inoltre la sua rigidità supporta la proliferazione e l'arrangiamento spaziale delle linee tumorali.

Il Matrigel è invece un biomateriale che enfatizza la velocità cellulare, importante per lo sviluppo degli eventi biologici e per l'espressione cellulare di alcune caratteristiche chiave dell'elevata malignità, come l'insorgenza di una struttura cellulare allungata. Nel gel sia l'Alginato che il Matrigel sono presenti in una concentrazione pari al 50%, permettendo alla linea tumorale di esprimere le caratteristiche della propria malignità, riproducendo il comportamento *in vivo*. È importante notare che queste caratteristiche morfologiche si vengono a sviluppare soltanto all'interno di questo gel, poiché possiede le caratteristiche meccaniche del tumore *in vivo*, evidenziando, quindi, l'importanza delle proprietà meccaniche e non solo delle proprietà chimiche del microambiente tumorale.

L'utilizzo del bioreattore in accoppiata al biomateriale composito, permette quindi di oltrepassare la scarsa integrità e stabilità dei modelli precedenti, poiché questo sistema può essere utilizzato per colture a lungo termine grazie alla robustezza conferita dall'Alginato, e allo stesso tempo, rende possibile la migrazione e motilità cellulare grazie alla presenza del Matrigel. Inoltre, la presenza della micro-fluidodinamica migliora gli scambi diffusivi portando ad un modello di studio che meglio approssimi il tessuto tumorale *in vivo*.

CONCLUSIONI

La metastasi è un processo multi-step che inizia con la diffusione della cellula neoplastica da microambiente tumorale primario e termina con la formazione di un secondo microambiente tumorale all'interno di un tessuto ospite. Le cellule neoplastiche della mammella tendono a prediligere la colonizzazione della metafisi, una particolare regione ossea interposta tra la diafisi e l'epifisi, costituita da cartilagine e tessuto osseo spugnoso racchiuso in un sottile strato di tessuto osseo compatto. Un sottoinsieme del processo metastatico può essere studiato *in vitro* solo se il sistema di riferimento è tale da produrre un risultato verosimile a quello proprio della struttura anatomica. Questo approccio permette la maturazione fenotipica dei pre-osteoblasti, attraverso una successione di fasi come la proliferazione, la differenziazione e la mineralizzazione, in osteociti incorporati all'interno di una spessa ECM ricca di collagene e che dopo mesi di coltura non mostra nessun segno di necrosi.

Gli ultimi 20 anni di ricerca oncologica si sono concentrati nel comprendere le basi genetiche dello sviluppo del cancro e cosa trasforma una cellula normale in un una tumorale. Infatti, nonostante le alterazioni genetiche siano chiaramente alla base della nascita e sviluppo del cancro, queste non sono le uniche protagoniste. Un tumore, in realtà, è un tessuto complesso e dinamico, fatto di cellule eterogenee in continua e costante evoluzione che tendono ad adattarsi all'ambiente che le circonda. Cellule tumorali e micro-ambiente si influenzano reciprocamente: la crescita aberrante della massa tumorale contribuisce a modellare composizione e natura fisica del microambiente. È proprio grazie a questa natura dinamica ed eterogenea che vengono selezionati i tratti che permettono alla cellula cancerosa di sopravvivere, moltiplicarsi e migrare per colonizzare organi distanti.

In moltissimi studi è stato affermato il ruolo del microambiente come regolatore della progressione metastatica e che l'utilizzo di una matrice 3D realizzata con biomateriali di origine animale, come il Matrigel, può mediare significativamente il fenotipo della cellula neoplastica. Nella ricerca sul cancro, la realizzazione di modelli tumorali ingegnerizzati, che integrano l'utilizzo di bioreattori e tecnologie microfluidiche, ha portato allo sviluppo di un microambiente tumorale molto più simile a quello *in vivo*, che aumenta le specifiche caratteristiche cellulari, come le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice.

Bibliografia

Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol*; 31(3): 417-26; 2007

Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Reis-Filho JS, Lee AH, Ellis IO. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. *Am J Surg Pathol*; 32(4): 513-23; 2008.

Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, van Wijnen AJ, Stein JL, Languino LR, Altieri DC, et al. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene*; 29:811, 2009.

Anastasi et al., *Trattato di Anatomia Umana*, volume III, Milano, 2° edizione, Edi.Ernes, 2012.

Balachander Gowri Manohari, Enhanced Metastatic Potential in a 3D Tissue Scaffold toward a Comprehensive in Vitro Model for Breast Cancer Metastasis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 27810–27822, 2015.

Carvalho Mariana R. ,Evaluating Biomaterial- and Microfluidic-Based 3D Tumor Models. *Trends in Biotechnology*, Vol. 33, No. 11, 2015.

Cavo Marta, A new cell-laden 3D Alginate- Matrigel hydrogel resembles human breast cancer cell malignant morphology, spread and invasion capability observed “*in vivo*”. *Scientific Reports*, 8:5333, 2018.

Chen YY, Hwang ES, Roy R, et al. Genetic and phenotypic characteristics of pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast. *Am J Surg Pathol*; 33(11): 1683-94, 2009.

Chivukula M, Haynik DM, Brufsky A, Carter G, Dabbs DJ. Pleomorphic lobular carcinoma in situ (PLCIS) on breast core needle biopsies: clinical significance and immunoprofile. *Am J Surg Pathol*; 32(11): 1721-6,2008.

Cristofolini L, In vitro evidence of the structural optimization of the human skeletal bones. *Journal of Biomechanics*, Volume 48, Issue 5, 2015, Pages 787-796,2014.

Da-Wei Li .From 2D to 3D: The morphology, proliferation and differentiation of MC3T3-E1 on silk fibroin/chitosan matrices. *Carbohydrate Polymers* 178, 69–77;2017.

Dhurjati R. , Extended-Term Culture of Bone Cells in a Compartmentalized Bioreactor. *TISSUE ENGINEERING* Volume 12, Number 11, 2006.

Dhurjati R. ,Metastatic breast cancer cells colonize and degrade three-dimensional osteoblastic tissue in vitro. *Clin Exp Metastasis* 25:741–752, 2008.

Duval K. ,Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *PHYSIOLOGY* 32: 266–277, 2017.

Fornetti J. .Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 33, No. 12, pp 2099–2113, 2018.

Fritton J.C. ,Loading induces site-specific increases in mineral content assessed by microcomputed tomography of the mouse tibia. *Bone* 36,1030 – 1038,2005.

Han Qiao and Tingting Tang.Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis. *Bone Research*,6:3,2018.

Hanby AM, Hughes TA. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. *Histopathology*, 52(1): 58-66; 2008.

Hughes LL, Wang M, Page DL, et al. Local excision alone without irradiation for ductal carcinoma in situ of the breast: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*; 27(32): 5319-24;2009.

Knychala J, Bouropoulos N, Catt CJ, Katsamenis OL, Please CP, Sengers BG. Pore geometry regulates early stage human bone marrow cell tissue formation and organisation. *Ann Biomed Eng*;41:917-30; 2013.

Kolb Alexis D. .Osteoblasts are “educated” by crosstalk with metastatic breast cancer cells in the bone tumor microenvironment. *Breast Cancer Research* 21:31,2019.

Krishnan V. , Dynamic Interaction Between Breast Cancer Cells and Osteoblastic Tissue: Comparison of Two- and Three-Dimensional Cultures. *Journal of Cellular Physiology* 226: 2150–2158, 2011.

Krishnan V. , In Vitro Mimics of Bone Remodeling and the Vicious Cycle of Cancer in Bone. *Journal of Cellular Physiology* 229: 453–462, 2014.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Hoon Tan P, Van de Vijver M. WHO classification of tumors of the breast. Lyon: IARC Press; 2012.

Lynch Maureen E, In Vivo Tibial Compression Decreases Osteolysis and Tumor Formation in a Human Metastatic Breast Cancer Model. *J Bone Miner Res.* ; 28(11): 2357–2367.2013.

Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchio C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*,57(2): 171-92; 2010.

Marchiò C, Geyer FC, Reis-Filho JS. Pathology and molecular pathology of breast cancer. In: Loda M, Mucci L, Mittelstadt ML, Van Hemelrijck M, Cotter MB, eds. *Pathology and epidemiology of cancer*. New York: Springer,2017.

Marshall Lauren E., Flow–perfusion bioreactor system for engineered breast cancer surrogates to be used in preclinical testing. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE* 11: 1242–1250, 2017.

Mundy GR, Demartino S, Rowe DW. Collagen and collagen-derived fragments are chemotactic for tumor cells. *J Clin Invest* 68:1102; 1981.

Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD Jr, Simpson JF. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet*,361(9352): 125-9; 2003.

Pietrabissa R, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*,seconda edizione, Pàtron editore,2010.

Reis-Filho JS, Pinder SE. Non-operative breast pathology: lobular neoplasia. *J Clin Pathol*, 60(12): 1321-7; 2007.

Rumpler M, Woesz A, Dunlop JWC, van Dongen JT, Fratzl P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface*.;5:1173-80;2008.

Sitarski Anna M..3D Tissue Engineered in Vitro Models of Cancer in Bone. *ACS Biomater. Sci. Eng.* , 4, 324-336; 2018.

Sowder Miranda E and Johnson Rachelle W, Bone as a Preferential Site for Metastasis. *JBMR1*, Vol. 3, No. 3,2019.

Swaminathan, V.; Mythreya, K.; O'Brien, E. T; Berchuck, A.;Blobe, G. C.; Superfine, R. Mechanical Stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res.* , 71 (15), 5075–5080; 2011.

Wei Zhu , Engineering a biomimetic three-dimensional nanostructured bone model for breast cancer bone metastasis study. *Acta Biomaterialia* 14,164–174,2015.

Wei Zhu, 3D printed nanocomposite matrix for the study of breast cancer bone metastasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*12, 69–79,2016.

www.react4life.com

