

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

**La compressione meccanica come trattamento innovativo per la
regressione del tumore della mammella**

Elaborato in
BIOMATERIALI

Relatore

Prof. Joseph Lovecchio

Presentata da

Lucrezia Baldi

Anno accademico 2019/2020

A chi mi ha spronato a migliorarmi ogni giorno

Indice

1. Stato dell'arte.....	4
1.1 Casistica.....	4
1.2 Patologia.....	5
1.3 Prevenzione.....	6
1.4 Stadiazione.....	7
1.5 Terapia locale: Chirurgia.....	8
1.6 Terapia sistemica: Chemioterapia.....	9
1.7 Terapia locale: Radioterapia.....	11
1.8 Terapia sistemica: Ormonoterapia.....	12
2. Scopo del lavoro.....	15
3. Metodo innovativo.....	16
3.1 Ingegneria tissutale tumorale.....	20
3.2 Materiali.....	21
3.2.1 Agar.....	21
3.2.2 Collagene.....	22
3.2.3 Idrossiapatite.....	24
3.2.4 PLGA.....	24
4. Revisione della letteratura.....	25
4.1 In Vivo Tibial Compression Decreases Osteolysis and Tumor Formation in a Human Metastatic Breast Cancer Model.....	25
4.2 Mechanically-Loaded Breast Cancer Cells Modify Osteocyte Mechano- sensitivity by Secreting Factors That Increase Osteocyte Dendrite Formation and Downstream Resorption.....	33
4.3 Mechanical stress-induced cell death in breast cancer cells.....	39
Conclusioni e sviluppi futuri.....	44
Bibliografia.....	46

1. Stato dell'arte

Il cancro è una delle maggiori cause di morte al mondo, seconda solo alle malattie cardiovascolari; nel 2018 sono stati stimati globalmente 9.6 milioni di decessi^{[1],[2]}. È un gruppo di malattie caratterizzato dalla crescita incontrollata di cellule, che talvolta invadono i tessuti limitrofi e/o si disperdono in altre parti del corpo, dando vita al fenomeno delle metastasi^[3]. Questo elaborato si concentrerà sul carcinoma della mammella, registrato statisticamente come il secondo tipo frequente al mondo e il più frequente tra le donne^[4].

1.1 Casistica

Tra la popolazione italiana, il cancro alla mammella è il tipo più frequente tra le donne e il più frequente in assoluto in base ai dati forniti dall'*Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM)* nel suo rapporto annuale "*I Numeri del Cancro in Italia (2018)*"^[5]. In questo, viene chiaramente espresso come nel 2018 siano previsti circa 52'800 nuove diagnosi tra la popolazione femminile e come nel 2015 sia stata la prima causa di decessi in seguito a tumore (12'274 casi), sempre tra la popolazione femminile. Statisticamente parlando, è stato registrato un aumento annuo lieve nell'incidenza (0.3%) e un calo più sostanzioso nella mortalità (0.8%). Dividendo la popolazione in fasce d'età si è riscontrato che la più colpita è quella tra i 50 e i 69 anni con un'incidenza del 5.5%, seguita dalla fascia dai 70 agli 84 anni con il 4.7% e per finire nella fascia dai 0 ai 49 anni l'incidenza è al 2.4%, il che rimarca la concretezza dei fattori di rischio che verranno analizzati in seguito. Esaminando i dati riguardanti la sopravvivenza, viene attestato che in Italia quella a 5 anni è pari al 87%, mentre quella a 10 anni al 80%. La prevalenza, ossia il numero di individui che vivono dopo una diagnosi positiva, in Italia conta 800'000 persone; questo dato dipende sia dall'incidenza che dalla sopravvivenza.

Fino a questo punto si è discusso di dati relativi al sesso femminile. Per quanto riguarda il sesso maschile, il carcinoma alla mammella occorre con una frequenza ampiamente ridotta: pari al 0.5-1% di tutti i casi di tumore alla mammella^[6]. I dati sulla sopravvivenza sono paragonabili ai dati per la popolazione femminile (in percentuale).

Considerando i dati appena illustrati, essi sono di rilevanza spiccata per quanto concerne la malattia trattata. È quindi opportuno studiarla approfonditamente, creando sempre migliori metodi per diagnosticare, prevenire e curare, al fine di migliorare le statistiche e di conseguenza la salute di un'ampia fetta della popolazione.

1.2 Patologia

Per quanto riguarda questa tipologia di cancro, ci sono una serie di fattori che aumentano la probabilità dell'individuo di contrarre la malattia (*Linee Guida: Neoplasie della Mammella*^[6], AIOM). I fattori possono avere diversa natura: dietetici e metabolici, ormonali, riproduttivi, familiari, radioterapia antecedente, precedente occorrenza della malattia e età.

Un aumento della probabilità di contrarre il cancro alla mammella è determinato dall'assunzione di alcool in grande quantità e la scarsa assunzione di vegetali. Altri due fattori legati allo stile di vita della persona sono la sindrome metabolica e l'obesità. Quest'ultima è un problema poiché, il tessuto adiposo in eccesso produce una quantità di estrogeni in eccesso, che caricano oltre il dovuto la ghiandola mammaria. Per quanto riguarda la sindrome metabolica, questa si contrae anche per ereditarietà, ma non è detto che non possa essere prevenuta mantenendo un corretto stile di vita. Per contrarla bisogna essere affetti da almeno tre su quattro dei seguenti fattori: obesità addominale, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa e diabete. Quest'ultimo è di particolare rilevanza poiché una delle conseguenze della sindrome è la resistenza all'insulina; l'organismo risponde quindi con una produzione più elevata di questo ormone, che agisce sulla membrana cellulare, arrivando ad avere quindi una proliferazione incontrollata.

Viene ribadito inoltre quanto sia importante nella prevenzione accompagnare a una dieta equilibrata (viene raccomandata la mediterranea) dell'attività fisica quotidiana.

L'assunzione di ormoni comporta un aumento di rischio di contrarre questa neoplasia. Pertanto, il rischio è aumentato nelle donne che assumono contraccettivi orali e/o terapia endocrina sostitutiva nel periodo della menopausa.

Sempre considerando l'azione degli ormoni sulla persona, donne con un lungo periodo fertile, donne che non hanno mai partorito o che hanno avuto la prima gravidanza dopo i 30 anni e che non hanno allattato al seno hanno una probabilità maggiore di contrarre la malattia.

Tra tutti i casi di carcinoma alla mammella, il 4-5% occorre per familiarità. Di questi, il 25% circa sono causati dalla mutazione dei geni BRCA-1 (le donne con questo gene mutato hanno il 65% di probabilità di ammalarsi) e BRCA-2 (le donne con questo gene mutato hanno il 40% di probabilità di ammalarsi). Nonostante queste siano le principali mutazioni, anche altre sono collegate alla malattia, come alcune sindromi. Tra queste, è importante evidenziare la Sindrome di Li-Fraumeni, che porta alla mutazione del gene TP53 e quindi all'erronea traduzione della proteina p53, noto oncosoppressore^[7].

In *Linee Guida: Neoplasie della Mammella*^[6], viene indicato che bisogna prestare particolare attenzione a precedenti radioterapie toraciche, soprattutto se il paziente vi è stato sottoposto prima

del trentesimo anno di età e viene indicato che precedenti occorrenze della malattia possono essere un fattore di rischio.

Senza alcun dubbio, l'età è un fattore altamente rilevante rispetto alla probabilità di contrarre la malattia. Come già indicato in precedenza, l'incidenza varia al variare della fascia d'età, arrivando a un picco di 5,4% nella fascia d'età tra i 50 e i 69 anni. È probabile che questo aumento sia correlato a tre fattori: alterazioni epigenetiche, stimolo endocrino prolungato (proporzionale all'età) e progressivo danneggiamento del DNA.

1.3 Prevenzione

La prima forma di trattamento è la prevenzione, la quale permette nella maggior parte dei casi di arrivare a una diagnosi in tempi utili per poter curare malattie quando sono ancora negli stadi iniziali. Nel caso del tumore alla mammella, la prevenzione viene fatta mediante un test chiamato mammografia^[8]. Secondo uno studio pubblicato sul *British Journal of Cancer*, dalla sua introduzione in Italia all'inizio degli anni '90, lo screening mammografico ha contribuito in maniera sostanziale alla diminuzione della mortalità in seguito a una diagnosi di carcinoma alla mammella^[9]. In questo studio viene indicato come la mortalità sia ridotta del 45% (con decrescita regolare) paragonando le pazienti sottoposte a screening e le non sottoposte. In particolare, nelle donne di età compresa tra i 50 e i 69 anni, dall'inizio del programma di screening si è registrata una diminuzione del 23% tra tutte le donne e del 40% tra le donne sottoposte a screening^[10].

In Italia, lo screening è erogato dalle Aziende Ospedaliere Regionali e offerto gratuitamente per mezzo del Sistema Sanitario Nazionale. La convocazione può non avvenire ogni anno e non pertiene tutte le pazienti, ma segue delle raccomandazioni generali^[6]. Per quanto riguarda le pazienti non ad alto rischio, viene indicato di convocarle:

- ogni due anni tra i 50 e i 69 anni;
- personalizzando la cadenza tra i 40 e i 49 anni d'età, caldamente consigliando la convocazione (per lo più annuale) dai 45 ai 49 anni;
- viene suggerito inoltre di estendere la convocazione alle pazienti di età compresa tra i 70 e 74 anni d'età; attualmente la Regione Emilia Romagna fornisce questo servizio^[11].

Per le donne ad alto rischio vengono indicati diversi tipi di screening in diversi momenti, a seconda della natura della predisposizione. Per le pazienti sottoposte a radioterapia toracica in giovane età (prima di compiere 30 anni) viene consigliata la mammografia, poiché più sensibile di altri test; viene consigliato di sottoporsi a questo trattamento di screening annualmente a partire dal venticinquesimo

anno di età o comunque a partire da 8 anni dopo il trattamento radio. Se invece si ha predisposizione familiare o genetica (mutazioni di geni o sindromi che hanno lo stesso effetto) è caldamente consigliata la Risonanza Magnetica Mammaria con mezzo di contrasto; questa è stato osservato essere l'esame più sensibile in questo caso, tanto da portare al non sottoporsi ad altri test, quale Rx-mammografico ed ecografia mammografica.

Il principale problema legato allo screening mammografico consiste nel fenomeno della sovradiagnosi (overdiagnosis), processo nel quale vengono localizzati carcinomi mammari che non sarebbero mai stati clinicamente rilevanti durante la vita della donna, se non si fosse sottoposta a una mammografia^[12]. Nonostante la comunità scientifica sia ancora divisa su come calcolare al meglio le percentuali di sovradiagnosi, uno studio della *Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro* (IARC) stima la percentuale attorno al 6.5% a livello europeo, cioè nel range del 1-10%^[10]. Questo studio usa dati soppesati in base all'incidenza e al tempo che intercorre tra il primo incontro con la malattia e l'effettiva diagnosi. Studi più recenti hanno ottenuto percentuali più alte. Le donne alle quali è fatta una sovradiagnosi riceveranno un sovratrattamento; è bene quindi che le pazienti siano consapevoli di questa possibilità prima di sottoporsi allo screening.

1.4 Stadiazione

Le terapie attuabili sulla neoplasia dipendono fortemente dal tipo di diagnosi che è stata fornita su di essa e, quindi, dalla sua stadiazione, ovvero una sorta di quantificazione dell'estensione del tumore dalla sede originaria^[13]. Al cancro al seno possono venir attribuiti 5 stadi, come afferma un articolo della *Fondazione Veronesi* a questo proposito^[14]:

- allo stadio 0 vengono attribuiti i carcinomi *in situ*, cioè una lesione pre-invasiva che rappresenta un precursore non obbligatorio del carcinoma infiltrante alla mammella^[6]. Secondo stime recenti, circa un quarto di tutti i carcinomi alla mammella è *in situ*, in particolare *duttali* (poiché posizionati nei dotti galattofori). In contrapposizione, i carcinomi *lobulari* (posizionati nei lobuli) *in situ* sono considerati marcatori di rischio (viene stimato questo aumenti di un 1% annuo) in quanto tumori “non maligni”^[15];
- allo stadio 1 appartengono tutti i tumori con dimensioni inferiori ai 2 centimetri. Questi non sono più *in situ*, cioè si sono espansi al di fuori del loro luogo d'origine (lobuli o dotti galattofori); tuttavia, non sono ancora entrati in contatto con i linfonodi. Per i tumori a questo stadio è ricorrenza la biopsia del linfonodo sentinella;

- i tumori allo stadio 2 hanno una dimensione compresa tra i 2 e i 5 centimetri; questi possono o meno aver raggiunto i linfonodi. Se questi sono stati raggiunti, può essere necessario lo svuotamento del cavo ascellare. Raggiunto questo stadio, si ha ancora una buona percentuale di sopravvivenza a 5 anni, superiore al 85%;
- raggiunto lo stadio 3, i tumori sono localmente avanzati indipendentemente dalla loro dimensione, il che vuol dire che si sono estesi ai linfonodi e/o alle aree circostanti rispetto la loro zona d'origine, come la pelle e la parete toracica al di sotto del seno. In questo stadio è pressoché sempre necessario lo svuotamento del cavo ascellare;
- lo stadio 4 viene assegnato ai tumori che si sono espansi a altri organi nel corpo, ossia è lo stadio metastatico. Le sedi più frequenti per le metastasi sono le ossa, il fegato e i polmoni. Le statistiche e le terapie per questo stadio tumorale variano disparatamente, poiché dipendono fortemente dalla localizzazione e dalla diffusione delle metastasi.

1.5 Terapia locale: Chirurgia

Attualmente, la chirurgia rappresenta il trattamento più praticato (se la neoplasia risulta operabile), combinata o meno con altri tipi di terapia, chiamati neoadiuvanti se antecedenti alla chirurgia e adiuvanti se posteriori. Ci sono due macro-tipologie di chirurgia praticabile: mastectomia e chirurgia conservativa; si discrimina tra i due per le ragioni più svariate, non ultimo il favore della paziente verso la prima tipologia^[16]. Nonostante lo scetticismo o il timore di alcune pazienti, ultimamente si tende a far sempre più interventi conservativi, considerando il fatto che, le statistiche a 10 anni di questi non si discostano di molto da quelle della mastectomia. Generalmente, si tende a tenere molto in considerazione anche l'aspetto estetico dell'organo una volta finita la terapia, essendo un aspetto che inficia molto sulla salute psicofisica della paziente.

Prima di procedere con la chirurgia è necessario determinare se il tumore è operabile o meno; esemplificando, il tumore allo stadio 4 viene ritenuto inoperabile, poiché è pressoché impossibile riuscire a rimuoverlo chirurgicamente senza intaccare altri tessuti adiacenti, cioè recidendo un margine di sicurezza in modo da avere la certezza di aver rimosso la neoplasia in toto. Generalmente, i tumori allo stadio 0, 1 e 2 sono ritenuti operabili, combinando l'intervento con una terapia adiuvante. Per i tumori al terzo stadio usualmente l'intervento è preceduto da una terapia neoadiuvante, per ridurre inizialmente la massa e soddisfare i criteri di operabilità; per esempio, uno di questi è che il tumore non sia attaccato alla parete toracica, il che richiederebbe di staccarlo antecedentemente all'operazione.

Le pratiche di chirurgia conservativa sono la tumorectomia e la quadrantectomia^[14]. La prima prevede la sola asportazione del tumore con conseguente asportazione di un margine di sicurezza che lo circonda, mentre la seconda prevede l'asportazione del 25% circa della mammella. Questi due approcci sono praticabili se il tumore è ben raggiungibile, ha un'unica sede e se il risultato estetico finale è soddisfacente. Questo è generalmente il caso dei tumori allo stadio 0 e 1.

La mastectomia (totale o semplice) è la rimozione completa del parenchima mammellare, del complesso capezzolo-areola e della pelle, lasciandone abbastanza per chiudere l'incisione^[16]. È una terapia altamente invasiva, considerata la mole di tessuto rimosso; viene consigliata alternativamente alla quadrantectomia per i tumori allo stadio 2 o 3 operabili; in questi casi è usualmente seguita dalla radioterapia adiuvante. Recenti trattamenti riguardanti questa pratica chirurgica sono le terapie cosiddette "nipple sparing" e "skin sparing", che cercano di mitigare uno dei maggiori difetti della mastectomia. Questa apporta un notevole cambiamento all'aspetto fisico della persona, cambiamento al quale si cerca di rimediare il prima possibile con interventi di chirurgia plastica. Di recente si tende a incorporare in un unico intervento mastectomia e ricostruzione, per non sottoporre la paziente a due interventi invasivi^[6]. Le due terapie sopra menzionate vengono prese in considerazione solo se la ricostruzione è di questo tipo e se si riesce ad effettuare un intervento sicuro, cioè che non lasci sulla persona residui di neoplasia; per esempio, perché sia preso in considerazione l'approccio nipple sparing l'area circostante il capezzolo non deve essere interessata dalla malattia. Alcuni studi riguardanti queste nuove terapie sembrano incoraggianti, collocando i dati sulla ricorrenza locale simili a quelli della mastectomia semplice, cioè approssimativamente al 6% per il mantenimento della pelle, mentre per il mantenimento del complesso capezzolo-areola è intorno al 2-5%; nonostante ciò, c'è bisogno ancora di studi su ampia scala per affermare ulteriormente la validità della terapia.

1.6 Terapia sistemica: Chemioterapia

La chemioterapia è una terapia sistemica che mira, con l'ausilio di farmaci, alla eliminazione delle cellule tumorali. Questi farmaci vengono chiamati antitumorali e, nonostante diventino sempre più specifici per ogni tipo di neoplasia, hanno lo svantaggio di arrecare danno anche alle cellule sane, analogamente agli altri tipi di trattamento^[17]. Può essere usata come terapia adiuvante o neoadiuvante (con risultati simili in materia di sopravvivenza con o senza malattia^[18]), ma anche come trattamento sistemico principale, in risposta a una diagnosi non favorevole verso l'operabilità della neoplasia. La terapia in sé consiste in una serie di cicli di assunzione di farmaci, scanditi a intervalli regolari e usualmente ripetuti nel tempo. Questi medicamenti interferiscono nei processi legati alla moltiplicazione cellulare, impedendo così la crescita della neoplasia attraverso un'azione citotossica

nei confronti delle sue cellule. Gli schemi chemioterapici sono a cicli poiché non tutte le cellule tumorali si trovano contemporaneamente in fase di replicazione (momento nel quale le suddette cellule sono sensibili ai farmaci), quindi diversificando il momento di somministrazione della terapia si aumenta la possibilità di colpire più cellule tumorali possibili. In generale, vista la moltitudine di farmaci di possibile utilizzo, sono somministrati in maniere diverse, che spaziano dall'ingestione orale all'introduzione intravenosa.

Come già descritto in precedenza, la terapia neoadiuvante aiuta a ridurre la massa tumorale per rendere possibile una compatibilità con l'operazione chirurgica di rimozione; recentemente, inoltre, viene usata anche per ridurre le masse tumorali in favore di una maggiore conservazione di tessuto in seguito alla chirurgia conservativa^[14]. Viene scelta come terapia adiuvante se migliore rispetto alle altre in termini di rischio di recidiva e di morte. Non ultimo anche in questo caso viene tenuta in considerazione l'opinione della paziente in merito a quale terapia preferisca, senza tuttavia minarne la potenziale riuscita della cura. In letteratura ci sono risultati contrastanti in merito a quando sia il periodo ottimale per iniziare la terapia, cioè quanto tempo aspettare dopo il decorso operatorio perché la terapia sia più efficace possibile. Ciò che traspare maggiormente è che non bisognerebbe aspettare più di 90 giorni^[6]. Viene indicato anche che la durata ottimale di questo trattamento varia dai 4 agli 8 cicli. Nelle pazienti ritenute adeguate a questo tipo di terapia bisognerebbe optare per una polichemioterapia.

Il tipo di farmaci da inserire nei cicli è basato maggiormente su una serie di fattori, quali positività o meno dei recettori ormonali e del recettore per il fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2). In particolare, nei tumori cosiddetti *triple negative*, cioè che non esprimono né i recettori ormonali né HER2 ad oggi la chemioterapia rappresenta l'unico trattamento. A supporto di ciò, la chemioterapia è stato constatato apporti una diminuzione del rischio relativo del 21-25% nelle pazienti che non esprimono i recettori ormonali.

Per quanto concerne la terapia sistemica, questa è consigliata nelle pazienti ad alto rischio, in quanto contiene anticicline e taxano. Quest'ultimo è un farmaco tossico per l'organismo ma molto efficace^[19]. Nell'ultimo decennio però è stata usata la sua tossicità in maniera produttiva, inserendo la molecola in particelle di albumina (nutriente ricercato dalle cellule tumorali), la quale funge da vettore per trasportare l'antitumorale fino a destinazione.

Uno dei problemi principali della chemioterapia, che spesso spaventa le pazienti almeno quanto la malattia stessa, sono gli effetti collaterali che possono manifestarsi una volta iniziato il trattamento^[17]. Questi variano in base al tipo di trattamento e alla risposta individuale. Grazie a recenti sviluppi della medicina, questi effetti indesiderati sono molto più ridotti rispetto al passato; se comunque risultassero insopportabili, i medici possono optare per cambiare la tipologia di farmaci, per

migliorare la qualità della vita della paziente. La maggior parte di questi disturbi ha durata limitata, svanendo entro qualche settimana dalla fine del trattamento, e la quasi totalità è reversibile; a questo proposito bisogna fare particolare attenzione a mantenere la fertilità della persona, ove possibile e richiesto. La *fatigue* è un sintomo comune nei riceventi chemioterapia; fa provare un senso di stanchezza e perdita delle forze. Un altro sintomo comune sono i disturbi digestivi, nausea e vomito; questi avvengono poiché le cellule delle mucose dell'apparato digerente si riproducono con un ritmo sostenuto, e quindi sono più soggette ai farmaci antitumorali. Anche i bulbi piliferi sono cellule che si riproducono velocemente, per cui la perdita dei peli corporei è pressoché un sinonimo della somministrazione della terapia.

1.7 Terapia locale: Radioterapia

Questa terapia locale fa uso delle radiazioni ionizzanti, come i raggi X, per curare le neoplasie. Si usa l'effetto distruttivo di queste, cercando di colpire solo le cellule cancerose^[20]. La radioterapia trova grande occupazione in campo curativo come cura adiuvante e neoadiuvante, la prima delle due la più frequente; ciononostante viene usata anche come trattamento principale *in loco*. Viene considerata specialmente come trattamento post-operatorio, per evitare che rimangano presenti nel corpo della paziente frammenti di neoplasia, anche dopo la resezione dei margini negativi^[16]. Ci sono diverse modalità di irradiazione: WBI (*whole breast irradiation* o irradiazione totale della mammella), PBI (*partial breast irradiation* o irradiazione parziale della mammella) e *nodal irradiation* (irradiazione dei noduli ascellari). L'approccio totale è quello più datato e quello più praticato, indicato per la maggior parte delle persone sottoposte alla chirurgia conservativa. A seguito della tumorectomia per le neoplasie più ridotte, l'irradiazione permette di diminuire significativamente le percentuali di recidiva locale e di aumentare la specifica sopravvivenza. Il trattamento adiuvante generalmente eroga circa 50 Gray [Gy] in circa 25 frazioni durante un lasso di tempo compreso tra le 5 e le 8 settimane. In seguito a ciò si procede a somministrare una dose "boost" di 10 Gy, che ha lo scopo di ridurre l'incidenza di recidiva locale, diminuendo del 4% la suddetta incidenza a 20 anni. Recenti studi affermano che la dose aggiunta dovrebbe essere sempre presente se la paziente ha meno di 50 anni.

Come terapia sistemica a sé stante, la radioterapia trova applicazioni nelle cure palliative per le emergenze oncologiche, per migliorare le condizioni alle quali il paziente è sottoposto. In *Linee Guida: Neoplasie della Mammella*^[6] a questo proposito viene fatto l'esempio della compressione midollare. Alcuni altri esempi riguardanti l'indicazione della radioterapia come cura palliativa sono:

tumore primitivo sintomatico non operabile, metastasi ossee con rischio di frattura, consolidamento dopo interventi.

L'irradiazione parziale può essere proposta solo a un limitato numero di donne, accuratamente selezionate e a basso rischio di recidiva. È stata sviluppata come tecnica meno invasiva dell'irradiazione totale, per avere un minor livello di tossicità. Può essere effettuata in diversi modi, i quali: brachiterapia, radioterapia intraoperatoria (IORT) e radioterapia a fasci esterni.

La radioterapia è prescritta anche a seguito della mastectomia, soprattutto se la malattia si presenta allo stadio avanzato^{[21],[22]}. A questo punto, bisogna fare particolare attenzione allo stato dei nodi ascellari, poiché pazienti con 4 o più di questi positivi hanno il 25% o più di probabilità di ricaduta regionale. Per queste pazienti, la radioterapia post mastectomia risulta una procedura standard, inserita usualmente nel trattamento.

Tra le pazienti definite a basso rischio, specialmente se in età avanzata, la sopravvivenza locale non è influenzata dall'esecuzione o meno della radioterapia, ma la recidiva locale sì, in particolare viene influenzata negativamente^[23].

Nonostante la radioterapia sia diventata una prassi in molti casi, non tutte le pazienti sono elegibili al trattamento. In particolare, non è raccomandato che le pazienti che sono state sottoposte in precedenza a irradiazione toracica e/o che hanno disturbi connettivi o vascolari e/o che sono incinte al momento dell'erogazione siano sottoposte al trattamento. Le donne in stato interessante già nel secondo/terzo trimestre di gravidanza potrebbero essere adatte al trattamento se postumo al parto; ciò significa che verrebbero sottoposte all'intervento di chirurgia durante il secondo/terzo trimestre, mentre inizierebbero l'irradiazione una volta partorito. Nel caso vengano diagnosticate durante il primo trimestre, generalmente viene preferita la mastectomia^[16].

1.8 Terapia sistemica: Ormonoterapia

L'ormonoterapia (conosciuta anche come terapia ormonale o endocrina) si prefigge il compito di impedire la comunicazione tra il tumore e gli ormoni, sia inibendo la produzione di questi, sia impedendo il contatto tra questi e le cellule tumorali. In generale sono poche le neoplasie che possono essere promosse nella crescita dagli ormoni; purtroppo, questa neoplasia è una delle poche soggette all'azione di queste molecole, che in questo caso sono gli ormoni estrogeni e il progesterone^[24].

Non tutte le pazienti possono essere sottoposte a questa terapia, poiché essa è efficace solo se il tumore presenta i recettori ormonali, cioè se il suo stato rispetto a questi è "positivo"; se, dopo la biopsia, viene riscontrata la positività, alla paziente viene consigliato di sottoporsi alla terapia ormonale^[16].

La terapia endocrina è generalmente usata come: terapia adiuvante a seguito di terapie locali e/o chemioterapia, per ridurre le probabilità di recidiva; cura palliativa per alleviare i sintomi di una malattia allo stadio avanzato; terapia neoadiuvante per diminuire la massa tumorale in vista di una terapia regionale. L'uso come farmaco preventivo per le pazienti ad alto rischio ha tutt'oggi pareri contrastanti nella comunità scientifica e, pertanto, non è ancora autorizzato.

Come già precedentemente indicato, questi farmaci agiscono in molteplici maniere, poiché se ne usa una svariata gamma^[24]. I modulatori selettivi dei recettori estrogenici, tra i quali il tamoxifene, sono inibitori competitivi dei recettori ormonali, legandosi al loro sito attivo al posto dell'ormone, non permettendo il legame di quest'ultimo con il recettore. Gli inibitori dell'aromatasi bloccano l'azione di questo enzima, cruciale per la trasformazione degli ormoni androgeni in estrogeni, con conseguente diminuzione di questi ultimi nel corpo della paziente. Gli analoghi agonisti dell'LHRH bloccano la produzione di ormoni da parte delle ovaie inibendo la produzione dell'ormone luteinizzante LH.

La vita della donna è caratterizzata da diversi periodi ormonali; in questa terapia è di rilevanza spiccata il periodo ormonale nella quale la paziente si trova. In particolare, si distingue tra il periodo pre-menopausa, caratterizzato da una produzione consistente di ormoni estrogeni da parte dell'organismo, e il periodo post-menopausa, nel quale la produzione degli estrogeni è significativamente ridotta rispetto al periodo precedente.

La terapia standard per le donne in pre-menopausa sono 20mg di tamoxifene al giorno per 5 anni, con possibilità di estensione a 10 anni se il medico lo ritiene opportuno. La costanza nella somministrazione di questo medicinale, che generalmente è introdotto nell'organismo per via orale una volta al giorno, ha permesso di ridurre il rischio di ricorrenza di quasi la metà, da quando si inizia la terapia al quarto anno, con seguente diminuzione del rischio del 30% negli anni dal quinto al nono. In aggiunta, la mortalità a seguito di questa terapia è ridotta del 30% nei primi 15 anni^[16]. Un'altra tipologia di trattamento per le pazienti in pre-menopausa è composta dalla concomitanza di tamoxifene e antagonisti dell'LHRH. Questa terapia può essere somministrata solo alle donne ancora in stato di fertilità, poiché grazie a questo trattamento le ovaie terminano di produrre gli ormoni e quindi si approda in uno stato di menopausa indotta; questo stato è temporaneo e reversibile e i cicli mestruali possono ricominciare a ripresentarsi dai 6 mesi all'anno dopo l'interruzione della terapia. Per le donne in post-menopausa è generalmente indicata una terapia a base di inibitori dell'aromatasi, sia prima che dopo gli interventi di chirurgia. Per le pazienti in questo stato ormonale è possibile anche un'integrazione in sequenza o concomitanza con il tamoxifene, ma questi inibitori sono preferiti. Tutti questi farmaci, purtroppo, condividono una serie di effetti collaterali, più o meno frequenti, che possono presentarsi durante il periodo di somministrazione. Tra questi è rilevante citare le vampate di calore e la sudorazione abbondante, i dolori alle articolazioni e ai muscoli, una comparsa

di osteoporosi precoce, scomparsa del ciclo mestruale, instabilità nella digestione e nel mantenimento del peso corporeo^[24].

2. Scopo del lavoro

Il cancro è la seconda causa di morte al mondo; ha causato nel 2018 circa 9.6 milioni di morti. Fra tutti, quello alla mammella è il secondo tipo per incidenza e il più frequente fra le donne. I trattamenti utilizzati fino ad oggi si sono rivelati certamente efficaci, ma hanno anche dei lati negativi. Dipendentemente dalla storia clinica della persona e dallo stadio della malattia, non tutte le terapie sono infatti applicabili. La chirurgia, specialmente quella totale, nonostante riesca a risolvere molti problemi, viene vista alle volte come una deturpazione dell'estetica della persona, quindi comporta spesso problemi emotivi nelle pazienti. La stessa chemioterapia, che in alcuni casi rappresenta l'unica opzione, viene temuta per i suoi effetti collaterali più della malattia stessa. L'ormonoterapia ha effetti collaterali reversibili dopo la sospensione del trattamento, ma per esserci sottoposte le pazienti devono avere una neoplasia che esprima i recettori ormonali, i quali non sono espressi da tutte. LA radioterapia, per quanto sia efficace nella rimozione del tumore anche come neoadiuvante, comporta l'esposizione a raggi X da parte delle pazienti, una procedura che deve necessariamente essere dosata nel corso della vita della persona. Questo lavoro ha quindi lo scopo di andare a effettuare una revisione della letteratura scientifica corrente, per evidenziare se esistono metodi innovativi per il trattamento del tumore alla mammella. In particolare, si vuole indagare se la compressione meccanica del tessuto tumorale può avere un effetto benefico sulla patologia. Saranno quindi presi in esame articoli che hanno valutato sia *in vitro* che *in vivo* come la suddetta stimolazione meccanica può essere un metodo valido per far regredire la malattia.

3. Metodo innovativo

I tumori si studiano da diverso tempo *in vitro*, con il supporto di colture 2D. Queste, però, si sono provate poco efficaci nel testare farmaci che poi si siano rivelati effettivi anche *in vivo*; statisticamente, il 95% dei medicinali che risultano promettenti nei test sulle colture bidimensionali e su animali, consecutivamente ai trial umani falliscono nel presentare gli stessi risultati^[25]. Questo fa supporre che i metodi fino ad oggi adottati nella sperimentazione non siano propriamente adatti per testare i farmaci antitumorali nelle prime fasi della stessa. I tumori, come tutti i tessuti, proliferano nel corpo in una struttura 3D; la mancanza di questa si pensa sia la principale causa del fallimento dei test antecedenti alla sperimentazione *in vivo*, poiché condotti su colture monostrato. La struttura e lo sviluppo spaziale hanno un ruolo cruciale nella proliferazione del tumore, poiché grazie a questi si riesce a ricreare al meglio la sua biologia; da notare è come, seguendo questa linea di ragionamento, in passato la biologia tumorale non veniva riprodotta fedelmente, quindi venivano fatti studi su tumori diversi rispetto a quelli che si trovano nei corpi.

L'ingegneria tissutale, una branca recente dell'ingegneria biomedica, potrebbe essere la soluzione ad alcuni problemi della medicina moderna. Quando si ha la necessità di fare un trapianto di organi, si va contro a molti ostacoli, come la compatibilità tra donatore e ricevente, la scarsità degli organi disponibili e l'impossibilità di mantenere essi fuori da un corpo a lungo^[26], dovendoli estrarre dal donatore e prontamente trapiantarli. Grazie all'ingegneria tissutale si può avere non solo un maggior apporto di organi, ma farli anche specifici per ogni paziente, così da aver meno problemi di rigetto. Un altro aspetto della medicina nel quale l'ingegneria tissutale può apportare considerevole miglioramento è lo studio di farmaci *in vitro*; in questo campo i miglioramenti sono apportati grazie all'uso di strutture 3D invece che 2D, così da avvicinare sempre di più la sperimentazione in laboratorio alla sperimentazione *in vivo*. Queste pratiche permetterebbero anche di diminuire la sperimentazione su animale che, nonostante sia doverosa, è una sperimentazione su esseri differenti, la cui risposta ai farmaci può anche differire da quella dell'essere umano. In questo contesto, le ricerche antitumorali hanno subito un notevole miglioramento.

È doveroso menzionare, però, che anche le strutture tridimensionali apportate dall'ingegneria tissutale hanno dei limiti, i quali magari non erano presenti nelle colture 2D. Per esemplificare, in queste colture monostrato l'apporto di nutrienti avviene attraverso un processo osmotico poiché, essendo colture senza spessore, basta metterle a contatto con essi. Nelle colture 3D, invece, la sola forza osmotica non basta per far arrivare i nutrienti in tutte le parti della struttura (in particolar modo al centro). Si usa quindi una combinazione di osmosi e convezione dei fluidi, poiché usando solo la

seconda si rischierebbe di lesionare i tessuti che si ha intenzione di fabbricare, quindi si preferisce un approccio ibrido.

Nell'implementazione di un sistema di ingegneria tissutale volto alla produzione di tessuti tridimensionali, i tre elementi fondamentali (che verranno analizzati in seguito) sono: cellule, scaffold e bioreattore. Le cellule vengono ottenute grazie a donazioni da pazienti; lo scaffold è ciò che dà la tridimensionalità alla coltura finale; il bioreattore è un dispositivo, che ricrea *in vitro* gli stimoli biochimici e biomeccanici presenti *in vivo*.

Negli organismi, le cellule non sono inerti tra di loro, ma comunicano grazie a dei segnali intracellulari. Queste comunicazioni permettono loro di vivere e dare l'input per la replicazione e il differenziamento. In questo contesto, è di vitale importanza la matrice extracellulare (ECM), una struttura esterna alla cellula presente in ogni tessuto del corpo e specifica per esso. È proprio questa struttura che trasmette alla cellula gli stimoli meccanici per la crescita e l'adesione, fornisce un'impalcatura meccanica nella quale la cellula risiede e regola la morfologia, progressione, migrazione e funzione metabolica (specie nelle cellule tumorali)^[27]: la matrice svolge un ruolo sia strutturale che funzionale. Da questi si evince quindi la crucialità della ECM, e quindi diventa imperativo riprodurla il più fedelmente possibile. Questa struttura, la cui composizione varia enormemente dal tipo di tessuto, contiene uno svariato numero di proteine, polisaccaridi e glicoproteine; trovare le giuste proporzioni tra tutte queste molecole è la chiave per la riproduzione della matrice, poiché sono queste che influenzano l'attività delle singole cellule^[26]. Grazie alle ECM sintetiche, meglio note nell'ingegneria come i sopracitati scaffold (poiché sono questi che compongono la struttura del sistema di ingegneria tissutale), sono già stati fatti studi che trattano la secrezione di fattori angiogenici. Anche le proprietà fisiche di questa matrice sono importanti, in quanto si sono rivelate importanti nelle diagnosi tumorali^[27]. Di recente, è stato riportato il fatto che la rigidità (*stiffness*) della matrice extracellulare ha un compito importante nel regolare molteplici funzioni cellulari. È stato trovato in alcune cellule neoplasiche, tra le quali quelle della mammella, una proporzionalità tra la rigidità (rispetto a quella usuale) e l'avanzamento della malattia. Le cellule, essendo in contatto con la matrice, poiché incapsulate dentro ad essa, percepiscono la sua rigidità mediante segnali di contatto. Le cellule tumorali e la ECM fanno parte di ciò che viene chiamato microambiente tumorale (*microenvironment*), il quale è fondamentale riprodurre fedelmente. Non è possibile farlo in una struttura monodimensionale, poiché non riporterebbe la complessità della struttura *in vivo*, cioè della terza dimensione. È stato scoperto di recente come i tumori allo stadio 4, cioè già sviluppatasi in metastasi, preferiscano certi microambienti ad altri^[27]. Volendo studiarli, quindi, bisogna tenere in considerazione il fatto che le strutture create devono il più possibile riprodurre il comportamento del cancro *in vivo*. Da ciò si evince il fatto che l'ambiente dove il tumore

prolifera è importante quanto la mutazione che l'ha prodotto. Oltre al tumore e alla ECM, fa parte del microenvironment tutto ciò immediatamente circostante al tumore, di qualsiasi dimensione e grado^[28]. Sono quindi compresi i vasi sanguigni (sia quelli già presenti che quelli formati per angiogenesi indotta dal tumore), le cellule del sistema immunitario e le cellule del tessuto connettivo. Il microenvironment è anche l'oggetto di una interessante teoria del 1889 d.C. del chirurgo inglese Stephen Paget, la cosiddetta teoria del "*seed and soil*". In questa teoria il tumore viene paragonato al seme (più precisamente, le sue metastasi), mentre il microambiente viene paragonato al terreno. Il cuore della questione è l'ipotesi fatta sulle metastasi: viene teorizzato come, perché nasca una metastasi, ci debba essere compatibilità tra la cellula tumorale (in potenza metastatica) che si muove nell'organismo e il microambiente nella essa quale si ferma; se questo risulta non adatto o ostile, la cellula tumorale fallirà nel suo compito di svilupparsi in metastasi^{[29],[30]}. Paget arrivò a questa conclusione esaminando più di 1000 autopsie di donne malate e notò come la locazione delle metastasi non seguisse uno schema casuale. Un possibile sbocco di ricerca futuro potrebbe riguardare la scoperta dei "terreni fertili", per mettere in atto delle opere di prevenzione e renderli aridi rispetto ai tumori. Un altro termine usato comunemente per chiamare il microambiente è "stroma".

È stato disquisito ampiamente dell'importanza della matrice extracellulare, del microambiente e delle loro funzioni e di come questi debbano essere riprodotti il più fedelmente possibile. Questa disquisizione trova un'applicazione pratica negli scaffold dell'ingegneria tissutale. Questi permettono lo studio più completo dei tumori (e non solo), poiché sono i veri costituenti della struttura tridimensionale che si aspira a fabbricare. Nonostante sia molto importante, la funzione strutturale non è l'unica operata da queste vere e proprie impalcature: operano anche funzionalmente, cercando il più possibile di imitare la matrice extracellulare del tessuto che si vuole ricreare. I materiali che compongono gli scaffold devono avere certe caratteristiche, prima fra tutte la biocompatibilità, poiché senza questa non c'è speranza di avere un prodotto finito utilizzabile. Altre caratteristiche importanti sono l'essere non-canceroso, non-antigenico, non-citotossico e anti-infiammatorio. Il materiale potrebbe avere o meno altre proprietà, a seconda dell'uso che se ne vuole fare: si può avere un materiale bioinerte se si vuole che il materiale non interagisca con le cellule, o bioattivo, quando il materiale interagisce con le cellule a un certo livello, per esempio aiutando l'adesione al materiale stesso, la migrazione o la proliferazione (questa modalità è di solito preferita)^[31]. Per far questo, alle volte, dentro agli scaffold vengono inseriti dei segnali biologici che, una volta raggiunte le cellule, innescano reazioni per meglio produrre il tessuto. Per garantire questa funzione si possono scegliere diverse tipologie di scaffold, poroso o fibroso. Dipendentemente da quale tessuto si aspiri a riprodurre, quindi, la struttura può essere o meno capace di degradarsi e riassorbirsi in concomitanza con la crescita del tessuto stesso, apportata dalla proliferazione delle cellule. In seguito, in questo

elaborato verranno esaminati in maniera più approfondita i tipi di biomateriali usati nell'ingegneria tissutale dei tumori in uso negli articoli esaminati.

Come fanno le cellule e lo scaffold a combinarsi? Perché questo accada è necessario che i due componenti interagiscano, fino a compiere la ri-cellularizzazione dello scaffold^[32]. La tecnica più usata è quella di trasportare e lasciar aderire allo scaffold la componente cellulare; questo procedimento viene chiamato *seeding* (semina). Dall'iniziale posizione all'apice dello scaffold, le cellule, in autonomia, migrano e si distribuiscono nello scaffold, complici la gravità e la migrazione cellulare. A volte, però, può capitare che le cellule sporgano dallo scaffold e quindi cadano al di fuori del sito scelto per la coltura. In questi casi (e in quelli nei quali non si è raggiunta la voluta densità cellulare) viene ripetuto il processo di semina quante volte basta per ottenere il risultato atteso. Purtroppo, questa tecnica sola non garantisce l'uniformità della distribuzione cellulare e quindi lo sviluppo controllato del tessuto. Alle volte, quindi, è bene trovare metodi alternativi, come l'incapsulamento delle stesse, per prevenire dei grandi spostamenti e ottenere un rilascio controllato. Le cellule sono sensibili agli stimoli meccanici e quindi bisogna maneggiarle con cautela. Per esemplificare, un problema che spesso occorre è la rottura della membrana apportata dallo sforzo di taglio presente nella punta delle pipette, quando queste vengono usate per spostare le cellule. L'incapsulamento aiuta anche in questo caso, poiché fornisce alle cellule una barriera aggiuntiva rispetto a quella già in loro possesso, cioè la membrana cellulare. Oltre a questa tecnica, altre possibili soluzioni potrebbero essere l'applicazione del *highly pressurized carbon dioxide* o la tecnica del *freeze-drying* del polimero quando è sotto forma di soluzione.

Il terzo elemento dei costrutti tissutali ingegnerizzati è il bioreattore. La sua funzione primaria è quella di permettere la formazione e proteggere il tessuto in via di sviluppo, considerato che questo non cresce all'interno del corpo umano, il bioreattore primo per eccellenza. Per adempiere a questa funzione, questi sistemi sono usualmente chiusi, nei quali le condizioni vengono controllate precisamente, così da monitorare la coltura ed evitare di alterarla. Oltre a contenere, proteggere e apportare nutrimento alla coltura, il bioreattore interagisce ulteriormente con essa attraverso la somministrazione di opportuni stimoli meccanici. Questi vengono trasmessi alle cellule mediante lo scaffold, ad esempio sottoponendolo a compressione attraverso bioreattori *ad hoc*^[33]. Il concetto di bioreattore non è nuovo, anzi; è lo stesso concetto sulla quale sono basati i sistemi per la fermentazione delle bevande. Le parti principali dalle quali è composto sono: un serbatoio (camera), la parte attiva (generalmente usata per apportare sostanze alla coltura), i sensori e il/i software per monitorare e gestire il processo la crescita del costrutto.

Quando le cellule vengono posate sopra allo scaffold sono in numero nettamente inferiore a quello che si auspica ottenere nel tessuto finale. Questo succede poiché dopo la semina deve avvenire il

processo di proliferazione; questa deve essere controllata, mediante l'apporto frazionato dei nutrienti. Oltre a questo apporto, un compito importante è quello di rimuovere i prodotti del metabolismo cellulare, non più utilizzabili.

Purtroppo, ancora oggi ricreare *in vitro* sistemi tumorali che rispecchino ciò che viene osservato *in vivo* è una sfida tecnologica, poiché bisogna tener conto di svariate cose, elencate precedentemente. Nonostante ciò, grazie all'ingegneria tissutale si riesce a fare un grande passo avanti nello studio della biologia dei tumori. Grazie a questi avanzamenti, è stata scoperta l'importanza dei segnali cellulari^[27], derivanti dall'interazione tra il tumore e il microenvironment: sono segnali autocrini (segnali chimici che modificano la stessa cellula che li ha prodotti) e paracrini (segnali chimici che modificano le cellule circostanti la cellula che li ha prodotti).

3.1 Ingegneria tissutale tumorale

L'ingegneria tissutale dei tumori (*tumor tissue engineering*) ha quindi il compito di riprodurre il più fedelmente possibili strutture neoplasiche in tre dimensioni, generando una struttura tumorale sulla quale poter lavorare più efficacemente che in passato. Altri problemi che si ha l'obiettivo di sormontare sono la mancanza d'interazione tra le cellule e la matrice extracellulare e la biocompatibilità del materiale sopra al quale si fa la coltura. Nell'articolo *Tumor Engineering: The Other Face of Tissue Engineering*^[26] la disciplina viene definita come segue: “la costruzione di complessi modelli di coltura cellulare che riprendono gli aspetti del microambiente tumorale *in vivo* per studiare la dinamica della progressione tumorale”. Quindi, in contrasto con le ricorrenti strutture di ingegneria tissutale principalmente composte da cellule sane, i costrutti dell'ingegneria tumorale sono formati per la maggior parte da cellule cancerose (maligne), che riescono a sopravvivere a lungo al di fuori del corpo umano. Questi costrutti possono anche essere impiantati in animali da laboratorio, per studiare le proprietà delle cellule che li caratterizzano, nonostante l'utilizzo di questa ingegneria miri a diminuire l'usufrutto di cavie da laboratorio animali, rimpiazzandoli.

Il modo più semplice per fare una coltura è impiantare un numero limitato di cellule tumorali in un gel di provenienza naturale, che realizzi una matrice extracellulare con un abbondante apporto di laminine (glicoproteine)^[34]. Tra queste spicca il Matrigel^[35], poiché non è specifico per un singolo tipo di cellule e quindi si può usare per vari esperimenti. È una miscela di proteine (tra le quali laminina e collagene IV) della matrice extracellulare, estratte dal tumore di Englebreth-Holm-Swarm dei topi; grazie alla sua composizione viene considerata come un preparato per membrana basale. Viene usata alle volte per fare dei saggi di penetrazione dei tessuti da parte dei tumori.

È comprovato ormai da almeno un decennio quanto sia importante, oltre all'interazione tra cellule cancerose, anche quella tra cellule cancerose e cellule sane, soprattutto per la crescita e lo sviluppo di un tumore. Per questo motivo, oltre a studiare le cellule tumorali e come interagiscono tra di loro, è stato proposto da Fischbach e Stroock^[36] di far interagire le cellule tumorali anche con cellule sane, per studiare più approfonditamente i fattori che trasformano una cellula in una cellula tumorale. Gli stessi, propongono anche di fare modifiche nello scaffold, per renderlo più simile alla vascolarizzazione prodotta dai tumori, creando degli impianti con dei canali, per studiare come le cellule cancerose si comportano allontanandosi dalla stessa vascolarizzazione. Per far questo si cerca di “disegnare dei percorsi con le cellule cancerose a diverso stadio e a distanza crescente”, con l'obiettivo di determinare se la distanza dal vaso e il grado di avanzamento della malattia influenzino l'invasività, facciano produrre fattori cancerosi o siano in grado di richiamare le cellule derivanti dal midollo che contribuiscono all'angiogenesi. Un altro studio che è più pratico fare *in vitro* che *in vivo* nel campo dei vasi sanguigni in relazione ai tumori, è quello fatto sui farmaci anti-angiogenici e su quanto beneficio apportino effettivamente nella lotta contro il tumore (e la sua vascolarizzazione). Nel cancro alla mammella, con il progredire della malattia, si perdono i segnali che conferiscono l'organizzazione del tessuto mammario da parte della proteina laminina e questo fa iniziare la produzione angiogenica; questa scoperta è stata fatta grazie a studi di ingegneria tissutale dei tumori, in particolare studi sulle matrici extracellulari di questi^[26].

3.2 Materiali

3.2.1 Agar

L'agar è un polimero polisaccaride estratto da alcune alghe rosse della famiglia delle Rhodophyta^[37]. La sua presenza è datata nella cultura giapponese fino a quattro secoli fa, come addensante gelatinoso per dolci, una variante vegetale in contrasto con la colla di pesce, usata in ambito culinario per gli stessi scopi. Da questa macromolecola, combinandola con acqua calda, si produce una soluzione che, lasciata raffreddare, diventa un composto gelatinoso solido. Le sue applicazioni scientifiche riguardano la corsa elettroforetica e l'essere un buon supporto per coltura cellulare, grazie alle sue proprietà che gli impediscono di idrolizzare con la maggior parte dei microorganismi a temperatura ambiente. Per la preparazione del gel si necessita di acqua calda (poiché l'agar è insolubile in acqua fredda)^[38] e una certa quantità della macromolecola, dipendentemente dalla concentrazione scelta; non si riesce a ottenere una concentrazione superiore al 10%, mentre soluzioni al 1.5% sono riportate essere limpide e isotrope. Nei riguardi della formazione chimica, è un composto: i suoi componenti

sono l'agarosio e agaropectina. Il primo è contenuto in quantità maggiore dentro all'agar e viene estratto da esso, purificandolo. Questo, a sua volta è formato dalla ripetizione di un'unità quaternaria composta da due glucidi, il β -D-galattopiranosio e il 3,6-anidro- α -L-galattopiranosio, legati insieme prima da un legame glicosidico β tra il primo e il secondo, poi da un legame glicosidico α dal secondo al primo. Il motivo per il quale è così difficile da idrolizzare è che pochi organismi hanno le agarasi (α e/o β), enzimi capaci di scindere questo legame.

Il processo di formazione del gel può essere ripetuto, sciogliendo la massa gelatinosa con più acqua calda e poi facendola raffreddare nuovamente; è quindi una trasformazione reversibile, che può essere iterata senza modificare meccanicamente il composto dal quale è formato^[38]. In acqua il composto è idrofilo e inerte; scaldando, la soluzione acquista una conformazione casuale e fluttuante a spirale. Raffreddando il tutto, la gelatina inizia a formarsi sotto ai 45°C, con la formazione di eliche coassiali sinistrorse. Queste sono legate da una fitta rete di legami idrogeno che ospitano acqua al loro interno. L'isteresi, cioè la differenza tra la temperatura di fusione e formazione del gel, è generalmente estesa, intorno ai 50°C, il che conferma il fatto che il gel non reagisce agli sbalzi di temperatura atmosferici, rendendolo un buon supporto.

Ogni anno, per la produzione di questo gel, vengono prodotti circa $6 \cdot 10^7$ kg di alghe. Di questi due generi in particolare vengono sfruttati: *Gelidium* e *Glacilaria*. La prima produce una sostanza di migliore qualità, ma la seconda, essendo presente in un'area più vasta geograficamente, predomina la produzione.

Una caratteristica fondamentale del composto gelatinoso è la proporzionalità inversa tra il diametro dei suoi pori e la concentrazione della soluzione. Non avendo una dimensione fissa, si possono adattare per poter incapsulare molecole di varie dimensioni.

3.2.2. *Collagene*

Il collagene è un polipeptide, costituente fondamentale del corpo umano: compone circa un terzo delle proteine del nostro corpo ed è il responsabile di tre quarti del peso "a secco" della pelle^[39]. Inoltre, è il componente principale delle matrici extracellulari. È presente in tutti i tessuti viventi come la principale componente strutturale di essi (il che si ricollega ai discorsi fatti sulla matrice extracellulare). Ci sono 28 tipi di collagene diversi, formati da almeno 46 catene di polipeptidi. La sua struttura è definita gerarchica, poiché più catene polipeptidiche formano una fibra di tropocollagene, che forma le fibrille e che a loro volta compongono le fibre.

I polipeptidi sono catene di amminoacidi, legati tra di loro mediante il legame peptidico. È stato osservato che, nelle molecole di collagene, l'amminoacido glicina (Gly) si ripeta periodicamente^[40]:

tutta la catena polipeptidica è composta dall'unione di tripeptidi, i quali hanno sempre a uno degli estremi l'amminoacido menzionato. L'unità funzionale del collagene è il tropocollagene, formato da tre catene polipeptidiche elicoidali sinistrorse che si combinano a formare una catena elicoidale destrorsa. Due tra queste tre catene sono identiche, mentre la terza è diversa da esse. Le catene del tropocollagene sono legate da legami idrogeno tra le glicine e gli altri amminoacidi; il passo delle eliche varia nei tipi di collagene. La Gly è talmente importante che numerose malattie sono state collegate con la sostituzione di questa molecola organica.

Risalendo ancora di più la gerarchia si trovano le fibrille, costituite dal tropocollagene, con le catene parzialmente sovrapposte. Queste a loro volta costituiscono le fibre, le cui catene possono essere

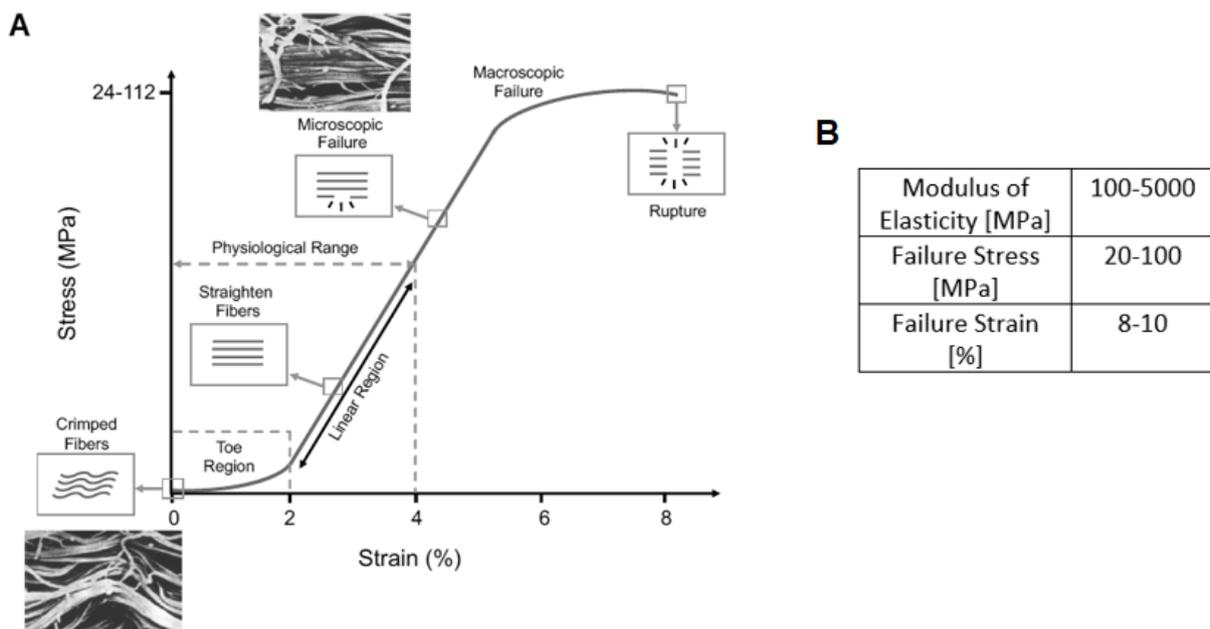


Figura 1 (A) Curva stress-strain del collagene. Nella figura è indicato lo stato delle fibre in ogni punto della curva; inoltre, vengono mostrate immagini che raffigurano il materiale. (B) Tabella contenente le proprietà meccaniche del collagene.

allineate o ondulate e la cui geometria e densità influisce sulle proprietà meccaniche dei diversi tessuti che compone. La sua curva stress-strain (figura 1) è fortemente non lineare, comprovando che è un tessuto che più viene sforzato più si irrigidisce.

Essendo un componente fondamentale della matrice extracellulare del regno animale, è un materiale ideale da utilizzare per produrre costrutti tissutali ingegnerizzati. Tra le sue caratteristiche più notabili sono da menzionare, oltre alla forza meccanica, la stabilità termica e la capacità di interagire con altre biomolecole. Oltre a ciò, è largamente usato come materiale per scaffold poiché è facilmente, altamente biocompatibile e biodegradabile^[41].

3.2.3 *Idrossiapatite*

L'idrossiapatite (HA)^[42] è la forma cristallizzata del fosfato di calcio, avente formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. È usata ampiamente come biomateriale per la fattura di scaffold ceramici porosi per l'ingegneria tissutale e per protesi in ortodonzia e ortopedia; è usata nella sua forma artificiale in questi campi poiché viene manifatta più simile possibile a quella presente nel tessuto osseo. Inoltre, ha un'eccellente biocompatibilità a contatto con esso.

3.2.4 *PLGA*

Il PLGA o acido poli(lattico-co-glicolico)^[43] è un copolimero formato dai monomeri acido glicolico e acido lattico. Viene sintetizzato attraverso condensazione o polimerizzazione ad anello; le modalità con le quali si polimerizza influiscono sulle proprietà finali del polimero, quindi è un polimero versatile. È un polimero biodegradabile, quindi utile per fare impianti nel corpo umano con in previsione un riassorbimento; inoltre è altamente biocompatibile, tanto che viene utilizzato ampiamente come vettore per la somministrazione dei farmaci, incapsulandoli al suo interno per una somministrazione più controllata.

4. Revisione della letteratura

In questo capitolo dell'elaborato verranno presi in esame tre articoli scientifici, scelti per comprovare il fatto che la stimolazione meccanica può essere un valido trattamento locale contro il cancro alla mammella e alle sue metastasi.

4.1 In Vivo Tibial Compression Decreases Osteolysis and Tumor Formation in a Human Metastatic Breast Cancer Model

L'articolo *In Vivo Tibial Compression Decreases Osteolysis and Tumor and Tumor Formation in a Human Metastatic Breast Cancer Model*^[44] è stato pubblicato a novembre 2013 sul *Journal of Bone and Mineral Research*^[45], il giornale ufficiale di *The American Society for Bone and Mineral Research*^[46]. Gli autori sono Maureen E. Lynch, Daniel Brooks, Sunish Mohanan, Min Joon Lee, Praveen Polamraju, Kelsey Dent, Lawrence J. Bonassar, Marjolein C. H. van der Meulen e Claudia Fishbach. Questo articolo riguarda lo sviluppo di prove di un modello *in vivo* (ratto) per ricercare le influenze che lo stimolo meccanico potrebbe avere in merito allo sviluppo e alla abilità osteolitica delle metastasi ossee del cancro alla mammella. Sono state prese in esame le metastasi ossee da cancro alla mammella poiché, come già affermato, questo tipo di cancro è uno dei più frequenti globalmente e le sue metastasi ossee risultano frequentemente inoperabili e dolorose. Come affermato nell'articolo, queste sono la maggior causa di morte per quanto riguarda pazienti allo stadio metastatico; rendono la vita del paziente molto dura, compromettendo la mobilità e infliggendo forti dolori. Quando una metastasi si forma in un osso, altera l'equilibrio di formazione e distruzione dello stesso da parte di osteoblasti e osteoclasti, risultando in una perdita di massa ossea dovuta a una spiccata attività da parte degli osteoclasti, promossa dai fattori secreti dal tumore. Questo porta generalmente a fratture e lesioni ossee, poiché si tende a caricare meno l'arto, quindi l'azione tumorale non viene contrastata ma viene aumentata, poiché meno carico meccanico sull'arto porta a un'aumentata azione degli osteoclasti. Usualmente, alle pazienti con metastasi ossee viene detto di stare a riposo; in contrapposizione, gli autori indicano che, per contrastare la perdita della massa, fare esercizio fisico (quindi stimolare meccanicamente) è visto come una potenziale cura adiuvante. Nonostante le prove fornite agli autori per fare questa affermazione, la stimolazione meccanica del cancro deve ancora essere studiata a fondo e caratterizzata. La tesi fatta all'inizio di questo articolo, la quale cerca la prova scientifica nel test in laboratorio descritto in seguito, è che lo stimolo meccanico abbia sia un ruolo fondamentale nella crescita e che capacità di influenza sulle cellule del tessuto osseo da parte delle cellule metastatiche di cancro alla mammella. Per validare questa ipotesi,

gli autori hanno effettuato esperimenti di stimolazione meccanica *in vivo* su ratti immunodeficienti, prima per avere una caratterizzazione meccanica di controllo, poi per investigare l'influenza della metastasi ossea. Il primo test consiste nella caratterizzazione meccanica delle ossa di ratto non affette da metastasi di cancro alla mammella, da usare come gruppo di controllo. La seconda misurazione riguarda la μ TC della struttura e l'analisi istologica della composizione ossea, per investigare i cambiamenti dovuti alla stimolazione meccanica. L'ultima misurazione viene fatta su una coltura 3D impiantata con cellule umane di cancro alla mammella sottoposte a compressione, per valutare gli effetti che la compressione meccanica ha sulle cellule cancerose.

I soggetti di queste misure *in vivo* sono femmine di ratto immunodeficiente SCID (n=46), allevate dai 3 ai 5 esemplari per gabbia con libero accesso al nutrimento; per monitorare la salute delle cavie, sono state fatte misure giornaliere riguardo ai loro parametri corporei. Gli autori precisano che gli animali sono stati trattati in maniera conforme alle regole etiche della struttura nella quale è stato fatto l'esperimento, la Cornell University^[47].

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica di controllo, un estensimetro è stato posizionato a metà della tibia sinistra di 5 ratti e, sotto anestesia, sono stati applicati dei cicli di compressione meccanica (mettendo le tibie degli animali dentro una macchina apposita, comprimendo dalle estremità) per determinare la forza corrispondente a uno spostamento di +600 μ m, corrispondente a un salto di 30cm completato da un ratto. Il picco di forza risultato è stato di 4.1N, dato essenziale poiché è stato usato negli esperimenti successivi. Per quanto riguarda le cellule cancerose, sono state usate le MDA-MB-231^[48], cellule del tessuto di ghiandola mammaria di esemplare femminile di *Homo Sapiens* affette da adenocarcinoma; questa linea cellulare è metastatica. Queste cellule vengono

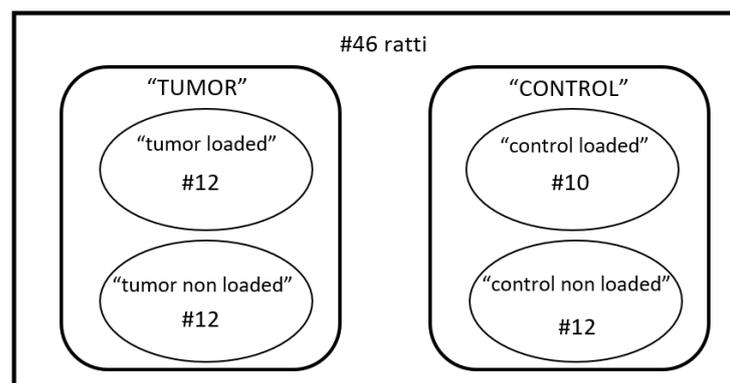


Figura 2 Divisione dei 46 ratti nei due gruppi "tumor" (composto da 24 ratti totali) e "control" (composto da 22 ratti totali) e nei loro sottogruppi.

mantenute nel DMEM arricchito con 10% FBS e 1% P/S a 37°C e 5% CO₂. Al raggiungimento di 7 settimane di vita, sono stati scelti casualmente 24 ratti (figura 2): sono stati anestetizzati e gli è stato

fatto un trapianto xenografico (esponendo l'osso) di $5 \cdot 10^5$ cellule cancerose sospese in $20 \mu\text{L}$ di PBS nel piatto tibiale (nel midollo). Ai restanti 22 ratti è stato fatto un trapianto placebo, iniettando solamente $20 \mu\text{L}$ di PBS, diventando quindi il gruppo di controllo. Dopo un giorno dal trapianto, tutti e due i gruppi sono stati ulteriormente divisi in due sottogruppi, uno da sottoporre alla compressione meccanica e uno no. 12 topi tra quelli trapiantati con il cancro e 10 tra quelli con il placebo sono stati sottoposti a cicli di compressione (1200 cicli a 4Hz per 5 giorni alla settimana) della durata di 2 o 6 settimane; durante il processo i soggetti erano tutti anestetizzati. I topi rimanenti (non caricati ciclicamente), sono stati soltanto anestetizzati e hanno assunto la funzione di controllo. Per essere sicuri che le misurazioni meccaniche fatte non siano influenzate dall'iniezione tibiale (apportata

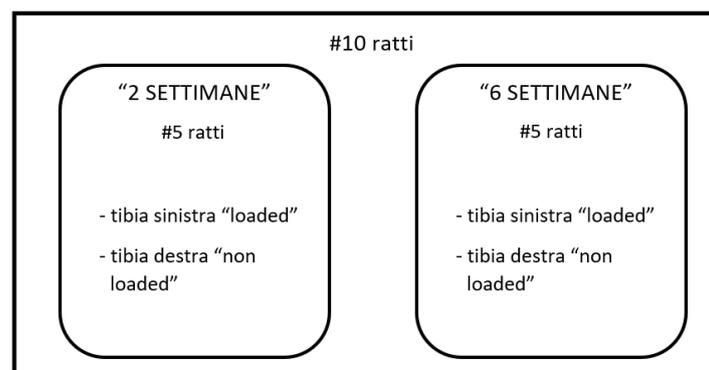


Figura 3 Divisione dei 10 ratti di caratterizzazione meccanica nei gruppi controllati dopo 2 e 6 settimane. Viene indicato inoltre come sono state usate la tibia destra (controllo) e la tibia sinistra (caratterizzazione) di ogni ratto.

anche al gruppo di controllo, seppur contenente solo PBS), è stata caratterizzata la risposta adattiva innata di riferimento, sottoponendo ulteriori 10 topi (figura 3) non iniettati a compressione meccanica ciclica (usando gli stessi parametri sopra descritti), 5 per 2 settimane e 5 per 6 settimane. Qui, come controllo non caricato, è stata usata la tibia destra.

Al termine delle misurazioni, i topi sono stati soppressi mediante inalazione di CO_2 e le cellule delle tibie sono state raccolte, fissate nella formalina al 10% per 48 ore e messe in una soluzione con 70% di etanolo.

Sono state fatte rivelazioni con la tomografia computerizzata a $20 \mu\text{m}$ e a $15 \mu\text{m}$, mentre per la preparazione del tessuto per l'esame istologico le ossa sono state decalcificate in EDTA al 10% con pH a 7.4 e poi inserite nella paraffina. Sono state quindi fatte delle sezioni longitudinali di $7 \mu\text{m}$, alle quali è stata tolta la paraffina con xilene e poi marcate. Il primo marcatore è l'H&E^[49], usato per rendere visibili le cellule al microscopio; è a base di ematossilina e eosina, che colorano rispettivamente di blu i nuclei delle cellule e in rosa la maggior parte delle proteine del citoplasma. Il

secondo marcatore è il TRAP^[50], ovvero fosfatasi acida resistente al tartaro; è una proteina che si lega il ferro e in questo contesto viene usata per l'individuazione degli osteoblasti.

Per quanto pertiene la caratterizzazione delle cellule tumorali, è stato creato uno scaffold poroso in PLGA e HA, formandolo per pressione a forma di disco. 4 dischi sono stati caratterizzati, sia in condizione dinamiche che quasi-statiche. Dopo essere stati sterilizzati con etanolo, sono state seminate le cellule cancerose fino ad arrivare a una concentrazione di $1.5 \cdot 10^6$ cellule/scaffold. Prima dell'utilizzo, sono stati mantenuti 3 giorni in un agitatore a scuotimento orbitale nelle condizioni standard di lavoro. Passato questo tempo, sono stati divisi nel gruppo di carico e quello di controllo e il primo è stato sottoposto a 1 ora di carico al giorno per 3 giorni; i parametri sono stati impostati dagli autori secondo la letteratura, per incitare la formazione osteoblastica. A seguito di ciò, gli scaffold sono stati fatti riposare un giorno nell'agitatore (dove peraltro riposavano tra un ciclo di carico e l'altro). Passato questo ulteriore giorno, le cellule sono state raccolte per fare i saggi: sono state sottoposte a qPCR per monitorare il DNA e l'espressione genica e sono state marcate. Un marcatore usato è la calceina^[51], una tintura permanente che serve per saggiare la vitalità delle cellule, poiché a contatto con le cellule vive cambia stato di fluorescenza, passando da non fluorescente a fluorescente verde. L'altro marcatore usato è il Propidium Iodide^[52], un reagente standard nello studio di vitalità. Questa molecola si lega al doppio filamento di DNA ma la membrana cellulare gli è impermeabile, quindi viene usualmente usato per valutare quando questa struttura viene a mancare.

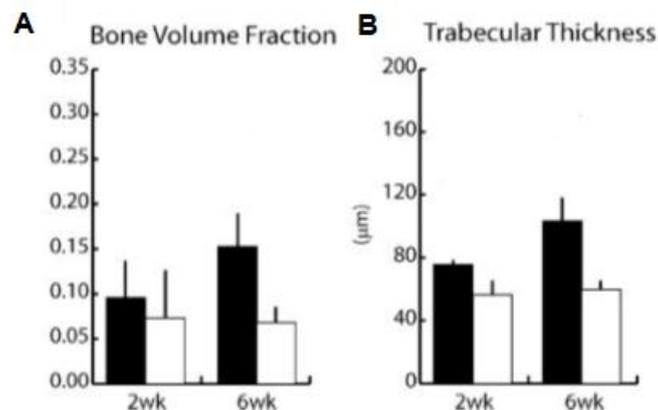


Figura 4 In nero vengono rappresentati i dati per il sottogruppo stimolato, in bianco quelli per il sottogruppo non stimolato, facenti parte del gruppo di controllo non iniettato. (A) Densità volumetrica dell'osso; si evince un aumento del 130% rispetto al gruppo non caricato. (B) Spessore trabecolare dell'osso; è indicato un aumento del 36% dopo 2 settimane e un aumento del 74% dopo 6 settimane.

Prima di concentrare l'attenzione sui risultati delle misurazioni riguardanti i ratti affetti da tumore, l'attenzione va focalizzata su quelli di controllo, vale a dire quelli non iniettati che caratterizzano la

risposta alla stimolazione meccanica, per assicurarsi che i risultati ottenuti in seguito non siano invalidati dall'impianto effettuato. Rispetto alla tibia destra non sottoposta a stress, dopo 2 settimane è aumentato del 36% lo spessore trabecolare nelle tibie sinistre. Dopo 6 settimane questo dato viene accentuato, portando la percentuale al 74%. Viene riferito inoltre che dopo 6 settimane la densità volumetrica dell'osso è aumentata del 130% rispetto al gruppo non caricato. Questi risultati (figura 4) confermano la letteratura a loro riguardo, la quale afferma che, sottoporre il tessuto osseo a stress meccanico incoraggia l'incremento di massa ossea, aumentando l'azione degli osteoblasti. Passando alle misurazioni fatte sui 46 ratti sottoposti a trapianto, già da quelle fatte dopo 2 settimane

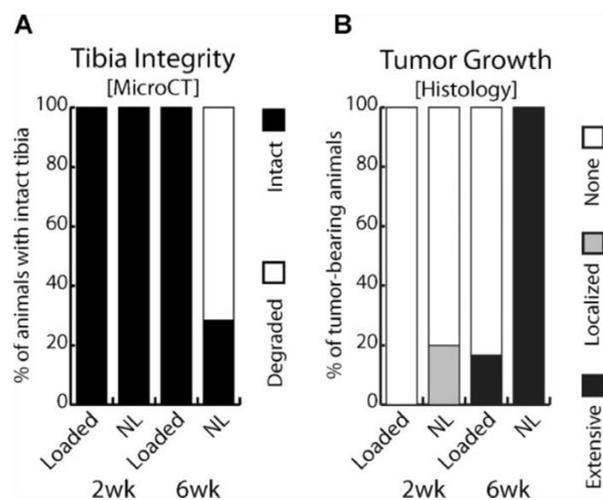


Figura 5 (A) Dati riguardanti l'integrità strutturale delle tibie nel gruppo al quale è stato fatto l'impianto, divisi nei due sottogruppi. Dopo 2 settimane in nessuno dei due sottogruppi viene rilevata degradazione, avendo entrambi il 100% dei campioni integri. Dopo 6 settimane, è chiaramente visibile come il gruppo "non loaded" (NL) riporti un'integrità altamente ridotta, pari al 29% (il che significa che il 71% dei campioni riporta degradazione, escludendo così il gruppo dall'indagine con la μ CT). In contrapposizione, il gruppo "loaded", grazie al caricamento meccanico, risulta abbia mantenuto l'integrità strutturale al 100%. (B) Vengono forniti i dati istologici riguardanti la crescita del tumore. Dopo 2 settimane nel gruppo "loaded" non c'è traccia di tumore, mentre nel gruppo "non loaded" si rileva un 20% di tumore localizzato. Dopo 6 settimane, a fronte di un rilevamento tumorale al 100% nel gruppo "non loaded", grazie alla compressione, nel gruppo "loaded" viene riportato un rilevamento tumorale significativamente minore.

si può notare una differenza nel gruppo al quale è stato iniettato il tumore, tra i suoi due sottogruppi "loaded" e "non loaded". Nel sottogruppo "non loaded" dopo 2 settimane viene rinvenuto un tumore nel 20% dei soggetti, localizzato nell'area dell'iniezione, mentre non viene rilevata nessuna degradazione (figura 5). I rilevamenti riguardanti la densità volumetrica dell'osso e lo spessore

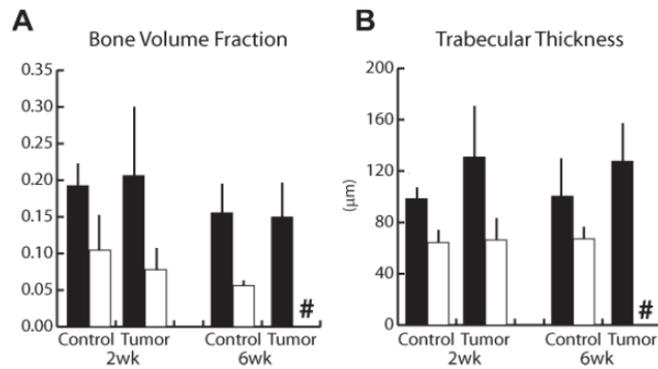


Figura 6 In nero viene rappresentato il sottogruppo “non loaded” (NL), mentre in bianco viene rappresentato il sottogruppo “loaded”. (A) Densità volumetrica dell’osso. Dopo 2 settimane, viene riportato un aumento nei due gruppi “loaded”; in particolare quello iniettato con tumore ha un aumento del 160%. I due gruppi NL riportano dati simili. Dopo 6 settimane, i dati del controllo e del gruppo iniettato continuano a rimanere simili, riportando un aumento significativo. (B) Spessore trabecolare dell’osso. Dopo 2 settimane, nel sottogruppo “loaded” con tumore viene rilevato un aumento del 97%, in continuo aumento anche dopo 6 settimane. Viene segnato con # il gruppo escluso dalla μ CT poiché il 71% dei campioni risultata degradato.

trabecolare vengono riportati simili a quelli del gruppo di controllo “non loaded” (figura 6). Invece, nel sottogruppo “loaded”, dopo 2 settimane di stimolazione meccanica non è possibile rilevare alcun tumore (figura 5), ma si possono rilevare osteoblasti attivi; per questo motivo, probabilmente, si

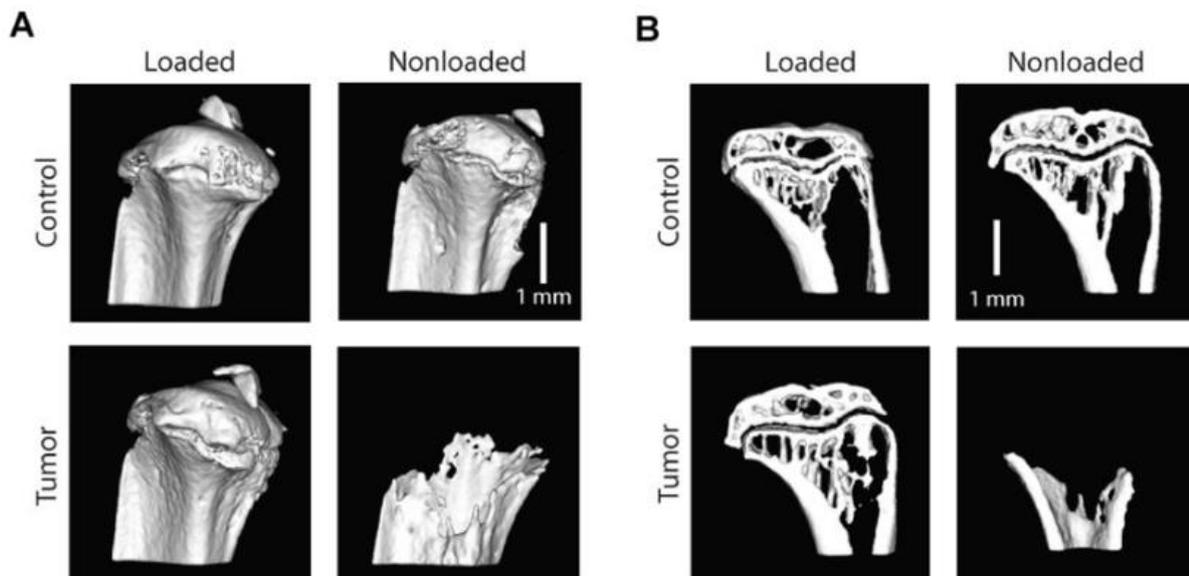


Figura 7 (A) Stato fisico delle tibie dopo 6 settimane, fatta tramite μ CT tridimensionale. È degna di nota la degradazione del gruppo affetto da tumore ma non caricato. (B) Sezione sagittale delle tibie dopo 6 settimane, ottenuta tramite μ CT. Come si può notare, i sottogruppi “non loaded” di controllo e “loaded” con tumore mostrano una morfologia simile, a riprova dei miglioramenti apportati nelle ossa malati dal carico meccanico.

misura un aumento del 160% della densità volumetrica dell'osso e del 97% dello spessore trabecolare rispetto al sottogruppo "non loaded" (figura 6). Queste differenze nelle misurazioni sono risultate ulteriormente accentuate nel passaggio da 2 a 6 settimane. Nel sottogruppo "non loaded", il 100% dei campioni esibisce un tumore riconoscibile istologicamente e il 71% è completamente degradato dal tumore, rendendo inutile la μ CT (figure 5, 7); inoltre, dall'esame istologico risulta la presenza di

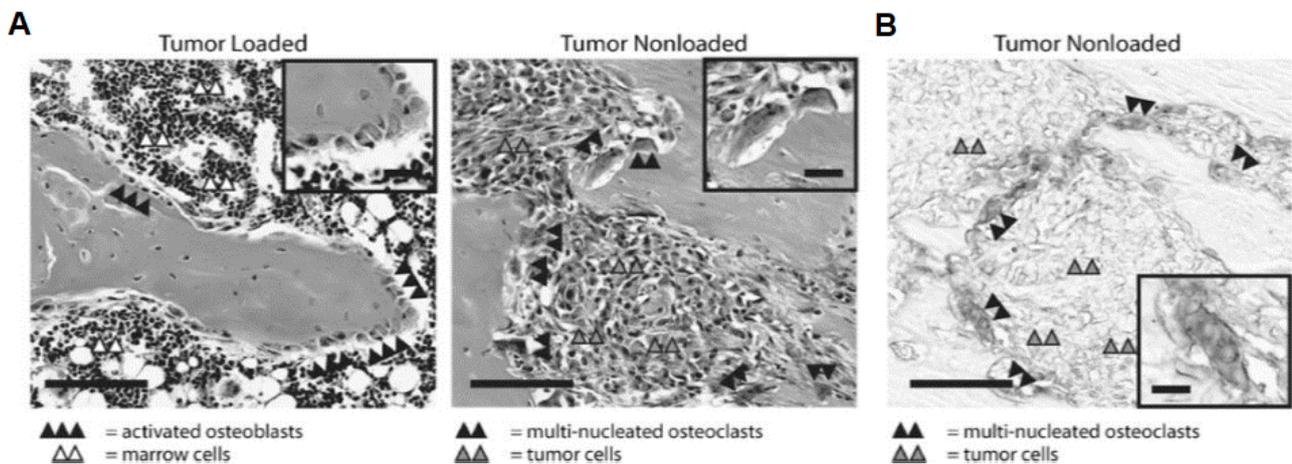


Figura 8 (A) Due sezioni trasversali dopo 6 settimane, rappresentative per i sottogruppi "loaded" e "non loaded" del gruppo affetto da tumore. Nel sottogruppo "loaded" viene indicata la presenza di osteoblasti attivi, mentre nel sottogruppo "non loaded" viene indicata la presenza di osteoclasti multinucleati. (B) Saggio con il marcatore TRAP fatto sulla sezione trasversale mostrata, per confermare ulteriormente la presenza degli osteoclasti.

osteoclasti multinucleati e operanti sulla superficie (figura 8), a riprova delle argomentazioni già affrontate riguardanti la diminuzione della massa di tessuto osseo in seguito alla formazione della metastasi. In contrapposizione, solo il 29% delle tibie alle quali è stato iniettato il tumore e sono state compresse meccanicamente per 6 settimane esibisce il tumore; in aggiunta, a un esame morfologico la forma di queste ossa è simile a quelle del gruppo di controllo "non loaded" (figura 7). Non è presente degradazione ossea, come nel gruppo di controllo "loaded", ma sono presenti osteoblasti, attivi, come un mese prima (figure 5, 8). Si può quindi ipotizzare che la stimolazione meccanica effettivamente contrasti la crescita e vitalità tumorale.

Per ciò che pertiene le misurazioni del gruppo di controllo, queste sono state paragonate a quelle apportate ai 10 ratti di caratterizzazione, per assicurarsi di non compromettere il test meccanico con l'impianto. È stato scoperto che questo intervento modifica parzialmente solo i risultati a 2 settimane (lo spessore trabecolare e la densità volumetrica dell'osso risultano più alti nel gruppo di controllo), ma i dati si normalizzano e dopo 6 settimane non vengono rilevate differenze degne di nota.

In tutti questi esperimenti la massa totale dei topi e la lunghezza delle tibie non è variata in maniera significativa.

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica del tumore, sono stati impostati come parametri 290 ± 20 kPa per il modulo elastico e $29\% \pm 9\%$ per la deformazione. Dalle analisi degli scaffold posteriori alla compressione meccanica risulta che la maggior parte delle cellule tumorali non sono state danneggiate e che il DNA delle cellule del carico e del controllo sono comparabili (figura 9), il che può portare a ipotizzare che il carico meccanico non influisca sulla vitalità e sullo sviluppo delle cellule tumorali. Approfondendo, viene indicato che i geni per l'espressione metastatica e per l'osteolisi non vengono modificati, mentre c'è una diminuzione del 35% dell'espressione del gene

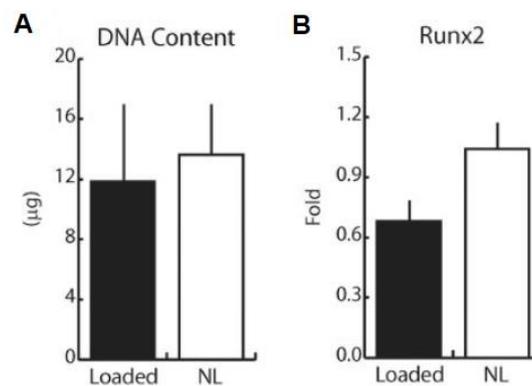


Figura 9 (A) Contenuto di DNA negli scaffold, misurato grazie all'indagine fluorometrica dopo 3 giorni di stimolazione. (B) Espressione del gene Runx2, ottenuta tramite qPCR dopo 3 giorni di carico. È evidente come la sua espressione sia ridotta (del 35%) a seguito della stimolazione.

Runx2 (figura 9), il quale è un promotore indiretto (attraverso una proteina tiroidea) dell'osteolisi e un oppositore della differenziazione degli osteoblasti. Questo dato fa presupporre agli autori che lo sforzo meccanico influisca indirettamente sulla vitalità e crescita della massa tumorale, non influenzando direttamente ma riuscendo a variare l'espressione genica che permette il cambiamento.

Viene inoltre spiegato dagli autori che la mancanza di ulteriori formazioni metastatiche nelle tibie può essere dovuta da due fattori: il tumore non ha avuto abbastanza tempo per stabilizzarsi nell'osso e innescare il processo di osteolisi, oppure la presenza del carico meccanico ha contribuito a combattere la secrezione dei fattori di crescita da parte della matrice ossea (mediante l'osteoclastogenesi), i quali promuovono la crescita e la migrazione tumorale.

Per concludere, gli autori affermano che, grazie a questo lavoro, è stato affermato un collegamento tra il carico meccanico e l'inibizione di tumori di origine secondaria. Viene affermato anche che ulteriori studi devono essere fatti, per investigare a fondo il ruolo del microambiente e i meccanismi molecolari che stanno alla base di questo processo.

4.2 Mechanically-Loaded Breast Cancer Cells Modify Osteocyte Mechanosensitivity by Secreting Factors That Increase Osteocyte Dendrite Formation and Downstream Resorption

Il secondo articolo proposto è *Mechanically-Loaded Breast Cancer Cells Modify Osteocyte Mechanosensitivity by Secreting Factors That Increase Osteocyte Dendrite Formation and Downstream Resorption*^[53], pubblicato a luglio 2018 nella rivista *frontiers in Endocrinology*^[54]; gli autori sono Wenbo Wang, Blayne A. Sarazin, Gabriel Kornilowicz e Maureen E. Lynch. Questo articolo è incentrato sugli osteociti, sulla loro crescita o diminuzione a seguito di stress meccanico e sulla presenza di metastasi ossee. Gli autori iniziano l'articolo informando dei presupposti per i quali l'anno fatto, cioè iniziano a parlare della relazione tra il cancro alla mammella e il tessuto osseo. Essendo questo tessuto una locazione molto ricorrente nella quale trovare metastasi cancerose in tumori allo stadio 4 (3 su 4), ha attirato l'attenzione della ricerca in merito al miglioramento delle condizioni di vita del paziente. In presenza di metastasi ossee si è soggetti a una forte osteolisi, con forte dolore, perdita di massa e fratture. La massa viene persa poiché si innesca l'azione degli osteoclasti, cellule atte alla modellazione delle ossa, in particolare alla loro distruzione; questo succede poiché il tumore si nutre delle sostanze che compongono la matrice extracellulare del tessuto. Quando l'osso è sano invece, si mantiene un certo livello di equilibrio tra la formazione e la distruzione ossea (la prima delle due è operata dagli osteoblasti, mentre l'equilibrio è mantenuto dagli osteociti), mantenendo all'incirca la stessa massa. Sempre nelle condizioni di salute, ma sottoponendo l'osso a stimolazione meccanica mirata, si accentua la sua formazione, con conseguente aumento di massa. Le argomentazioni trovate in letteratura a favore del carico meccanico delle metastasi ossee e del tessuto osseo sono le seguenti: aumentare la sollecitazione meccanica protegge dall'osteolisi da metastasi nello stesso tempo nel quale promuove la formazione ossea (scoperta fatta sui topi da laboratorio) e inibisce le metastasi. In modelli preclinici è risultato che il mezzo per la connessione fisica tra osteociti e le cellule cancerose o se stessi sono i dendriti, il cui compito è di facilitare la comunicazione. Il collegamento tra queste formazioni e la sollecitazione meccanica viene dato grazie a uno studio sul cancro alla mammella: in questo, in seguito all'applicazione di un flusso (di fluido), viene spiegato come gli osteociti producano ATP e la espellano attraverso i dendriti, bloccando l'avanzamento canceroso. Grazie a questa conoscenza pregressa, gli autori speculano che gli osteociti (e in particolare i dendriti) siano ciò che permette la trasmissione dello stimolo meccanico, opponendosi al cancro.

Le ipotesi fatte dagli autori precedentemente all'inizio degli esperimenti sono:

- i fattori secreti dalle cellule della neoplasia alla mammella modificano la risposta meccanica alla sollecitazione da parte degli osteociti;
- la stimolazione meccanica delle cellule cancerose della mammella modula il loro effetto sulla risposta meccanica degli osteociti.

In questa esperienza, le cellule del tessuto osseo usate sono gli osteociti MLO-Y4^[55], scelti dagli autori poiché consapevoli di riuscire a ottenere una risposta meccanica chiara. Sono cellule appartenenti alla famiglia degli osteociti del ratto. Specificatamente, vengono estratte dalle ossa lunghe di questi animali^[56]. Questi osteociti sono stati sviluppati su uno strato di collagene appoggiato su una plastica da coltura. Come nutrimento è stato usato il α MEM arricchito con il FBS al 2.5%, P/S al 1% e CF al 2.5%. La coltura è continuata fintanto che le cellule non hanno ricoperto in maniera aderente l'area per una percentuale di 70%. Dopo aver raggiunto questo obiettivo, le cellule sono state seminate in dei vetrini ricoperti da collagene per un totale di 2000 cellule/cm².

Per quanto riguarda la coltura tumorale, sono state usate le cellule metastatiche MDA-MB-231^[48] nutrite con il DMEM arricchito con FBS al 10%. Da queste lo scopo era di generare le secrezioni tumorali, che sono state raccolte dopo svariati passaggi. Il processo inizia con l'impianto delle cellule nella beuta T150 fino al raggiungimento del 90% di confluenza; a questo punto il mezzo è stato sostituito con DMEM arricchito con FBS al 1% e P/S al 1% ed è stato atteso il passaggio di 24 ore. Trascorse queste, il loro mezzo (*tumor conditioned media*, TCM) è stato collezionato, concentrato x10 in centrifuga e diluito fino a raggiungere una concentrazione x2 quando miscelato insieme al mezzo degli osteociti. Come controllo è stato usato DMEM arricchito con FBS al 1% e P/S al 1% senza cellule. Per quanto riguarda la raccolta del mezzo proveniente da cellule stimulate meccanicamente, dopo l'impianto nella beuta, questa è stata fatta oscillare per 6 ore, per poi proseguire con gli altri passaggi; le beute sono state scelte per questo passaggio in maniera casuale, scegliendo tra tutte quelle disponibili: quelle non scelte hanno costituito il gruppo delle non stimulate. Tutte le colture sono state eseguite sotto condizioni standard, cioè a 37°C e con percentuale di CO₂ al 5%.

È stato scelto lo sforzo di taglio apportato da un flusso di fluido poiché viene riportato che le cellule MLO-Y4 siano particolarmente sensibili a questo tipo di stimolazione. Il mezzo con il quale è stato applicato questo stimolo meccanico è la piattaforma oscillante, sopra alla quale sono stati adagiati i dischi di coltura; il movimento è verticale, per ottenere una forte risposta anabolica dalle cellule. Il massimo sforzo di taglio ottenuto è circa 1.1kPa, un valore già presente in letteratura. Lo stress meccanico è stato applicato con una frequenza di 1Hz per 2 ore al giorno in un periodo di tempo di 3 giorni, (arrivando a un totale di 6 ore), mantenendo la coltura in laboratorio.

Sono stati fatti quattro tipi diversi di esperimenti: per avere parametri di controllo, gli osteociti sono stati prima caratterizzati sia quando sottoposti a stress meccanico, sia quando sottoposti alle secrezioni tumorali (raccolte dalla coltura tumorale come già spiegato); a valle di ciò, sono stati caratterizzati quando sottoposti contemporaneamente a stress meccanico e alle secrezioni tumorali. Infine, per riprodurre più fedelmente possibile le condizioni *in vivo* (dove, grazie al movimento del corpo umano, sia la metastasi sia il tessuto osseo viene stimolato meccanicamente), sono stati caratterizzati osteociti sottoposti contemporaneamente a stress meccanico e a secrezioni tumorali, con la peculiarità che anche queste sono state sottoposte a stress meccanico, antecedentemente alla raccolta. Dopo tutte le prove le cellule sono state collezionate per essere analizzate. Di tutte le varianti sono stati fatti dei gruppi di controllo, i quali non sono stati stimolati meccanicamente.

Sono stati fatti saggi di fluorescenza ed espressione genica. È stata usata la falloidina^[57] per monitorare la formazione dei dendriti; questa è un peptide biciclico, appartenente alla famiglia del fungo mortale *Amanita Phalloides*. Legandosi alla F-actina, è indicata per monitorare la variazione di numero dei dendriti, i quali sono indicatori per la sensibilità meccanica, in quanto aumentano di numero e dimensione in seguito all'attività anabolica. Viene usato il DAPI^[58] (4',6-diamidin-2-fenilindolo) per monitorare il numero cellulare; questo è un marcatore fluorescente permanente, che si lega nelle regioni di DNA nelle quali sono presenti molte sequenze A-T. La preparazione delle cellule per questi due saggi (fatti contemporaneamente) inizia con il fissaggio con paraformaldeide (4%), seguita dal lavaggio con FBS e alla permeabilizzazione con il Triton-X (0.05%); dopo questi passaggi le cellule sono state incubate per 1 ora con falloidina a 1:2000 e DAPI a 1:5000. Per determinare il grado di apoptosi degli osteociti è stato usato il TUNEL^[59]. È un marcatore che lega la DNA nucleotidil-esotransferasi e perciò è molto utile per individuare episodi di frammentazione del DNA. La preparazione delle cellule per questo test segue gli stessi passaggi già descritti, con l'aggiunta del TUNEL (in quantità come suggerite dal produttore del prodotto). Come strumento di imaging è stata usata la microscopia a dischi rotanti confocali. I saggi di espressione genica sono stati fatti usando la qPCR. Per preparare questo test è stato estratto il mRNA e la sua purezza è stata affermata grazie a uno spettrofotometro. In seguito, è stata eseguita la qPCR con 25-50ng di cRNA in un volume di 20µL contenenti 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix. È stata cercata l'espressione dei geni E11/gp38 (regola la formazione dei dendriti), RANKL (controlla l'apoptosi degli osteociti) e OPG (controlla la differenziazione degli osteoclasti e la loro funzione).

A seguito delle analisi sono stati riportati risultati interessanti in merito alle tesi poste dagli autori. Nei primi due esperimenti, viene reso evidente come la stimolazione meccanica aumenti il numero di

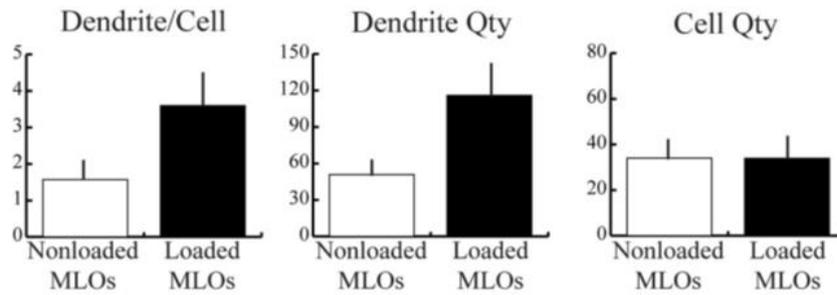


Figura 12 Risultati delle analisi del primo esperimento, fatte mediante immagini. Da notare come il rapporto dendrite/cellula aumenti a fronte di un aumento dei dendriti, mentre il numero di cellule rimane pressoché lo stesso, confermando come la stimolazione meccanica faccia aumentare il numero dei dendriti.

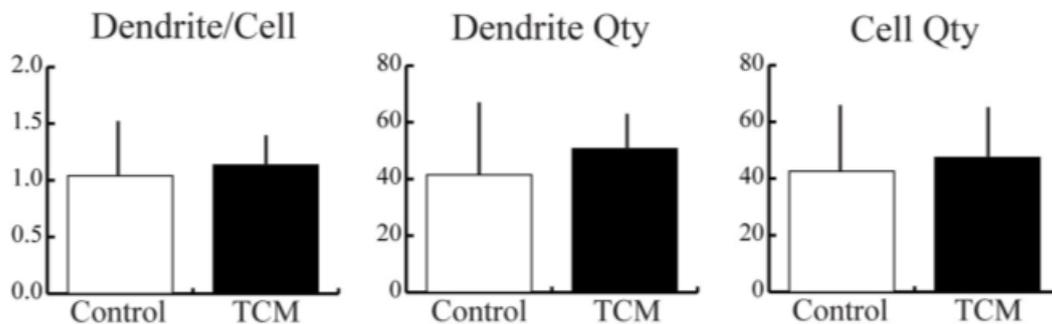


Figura 11 Risultati delle analisi del secondo esperimento, fatte mediante immagini. I valori, in seguito all'esposizione al TCM, non cambiano significativamente.

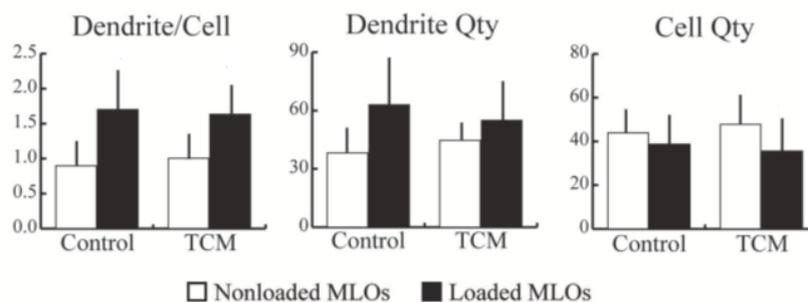


Figura 10 Risultati delle analisi fatte al terzo esperimento. Il rapporto dendrite/cellula aumenta mediante l'applicazione dello stress meccanico sia nel gruppo di controllo che nel gruppo sottoposto a TCM. La differenza tra i due gruppi è da cercarsi nelle quantità, poiché mentre nel gruppo di controllo il rapporto è aumentato poiché è aumentato il numero dei dendriti, nel gruppo con TCM è aumentato in seguito a una diminuzione del numero di osteociti.

dendriti per cellula senza alterare il numero delle cellule, effettivamente facendo crescere i dendriti (figura 10). In contrapposizione, la sola esposizione degli osteociti alle secrezioni tumorali semplici non fa aumentare questo rapporto, ma non fa neanche diminuire il numero di cellule del tessuto osseo

(figura 11). Nella prova nella quale è presente la coesistenza di TCM e stress meccanico viene aumentato il rapporto tra i dendriti e le cellule poiché l'esposizione ai fattori tumorali combinata con la stimolazione fa diminuire il numero di cellule, alzando di conseguenza il rapporto (figura 12). Si ritrova lo stesso risultato ma accentuato nell'ultima prova, poiché il rapporto viene massimizzato

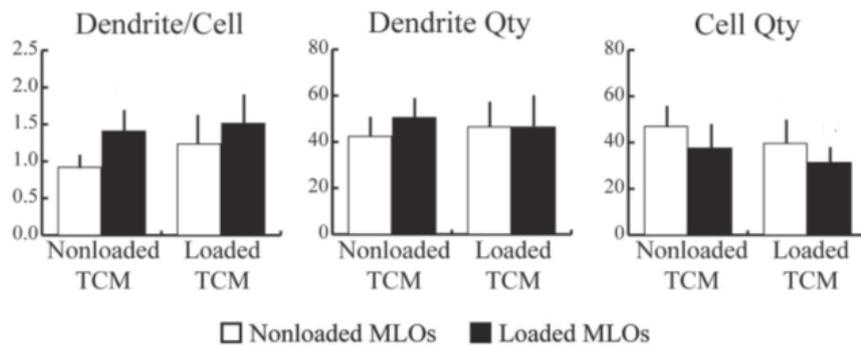


Figura 13 Risultati delle analisi fatte al quarto esperimento. Il rapporto dendrite/cellula, nel gruppo "loaded TCM", risulta aumentato a seguito della stimolazione, ma risulta altrettanto evidente come la quantità dei dendriti nello stesso gruppo rimanga uguale. Questo aumento nel rapporto è da imputare alla diminuzione del numero di cellule. Questa è una riprova del fatto che la stimolazione meccanica delle cellule tumorali influisce sulla quantità dei dendriti, quindi sulla sensibilità meccanica degli osteociti.

quando anche le cellule tumorali dalle quali provengono le secrezioni sono state caricate (figura 13). Da queste ultime due misurazioni si evince il fatto che, quando le cellule dalle quali provengono sono sottoposte a stress meccanico, le secrezioni tumorali modulano la formazione dei dendriti indotta dal flusso di fluido (stress). Nonostante ciò, è bene ribadire che i fattori secreti dalle cellule devono

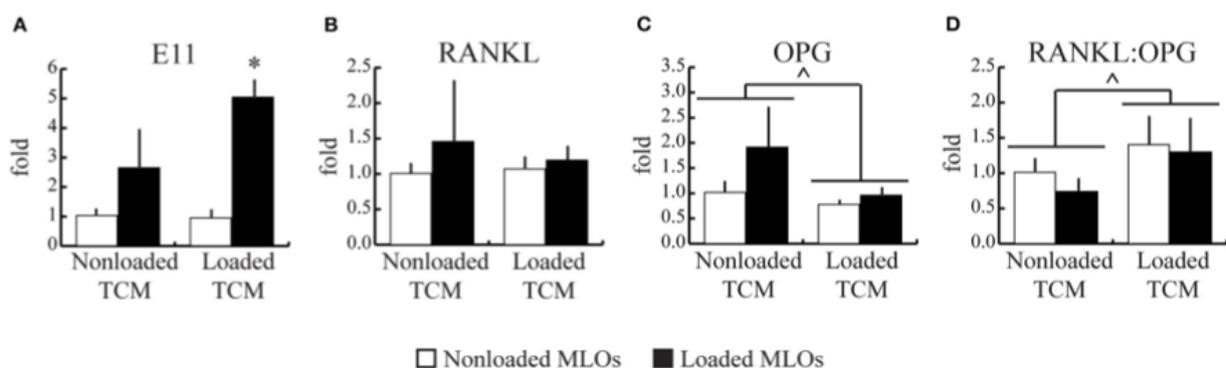


Figura 14 I dati sull'espressione genica sono stati ottenuti mediante qPCR. (A) Espressione del gene E11/gp38. La presenza delle secrezioni stimolate aumenta ulteriormente l'espressione del suddetto gene, il che significa che la differenziazione dei dendriti è in corso. Questo dato fa capire come, nonostante l'azione distruttrice del tumore, sia in atto anche il rimodellamento dovuto all'azione meccanica. (B) Espressione del gene RANKL, del quale non si rilevano cambiamenti significativi. (C) Occorrenza del gene OPG, il quale è inferiore nel gruppo trattato con "loaded TCM" ma non stimolato. (D) Ratio RANKL/OPG, la quale è maggiore per le cellule caricate che non. Questo significa che una diminuzione nel riassorbimento è accentuata quando la neoplasia è stimolata a sua volta.

necessariamente essere compresenti con lo stimolo meccanico per ottenere questo risultato. Un aumento nel numero dei dendriti viene inteso come un aumento nella sensibilità meccanica, poiché questi sono la parte più sensibile degli osteociti. A sua volta, indicano gli autori, un aumento nella sensibilità meccanica potrebbe tradursi in un incremento nella formazione ossea, come riportato da alcuni studi; questo però, è da verificare con ulteriori esperienze, poiché potrebbe portare a un bilanciamento tra il numero di osteociti prodotti grazie alla stimolazione meccanica e quello degli osteociti distrutti dal TCM (aumenta il numero di dendriti per cellula poiché diminuiscono il numero di cellule quando queste interagiscono con il TCM e vengono caricate meccanicamente).

Per quanto riguarda l'espressione genica (figura 14), viene riscontrato un aumento della ricorrenza del gene E11/gp38 nel gruppo di osteociti trattato "loaded TCM" che è stato sottoposto a stimolazione meccanica; questo dato indica un aumento nella differenziazione degli osteociti, il quale indica che, nonostante le cellule diminuiscano, c'è anche un'azione riparatrice in atto. È questo il dato il quale fa capire che il rapporto dendrite/osteocita aumenta non solo per la diminuzione del numero di osteociti, ma anche per il rimodellamento dovuto all'applicazione dello stress meccanico. Per quanto pertiene il saggio genetico con il RANKL, non si osservano cambiamenti in nessun esperimento, mentre la ricorrenza di OPG diminuisce nel gruppo trattato con TCM ottenuta da cellule stimolate ma non stimolato a sua volta. Questo risulta in una ratio RANKL/OPG maggiore nelle cellule caricate, la quale può coincidere con l'inizio di un ciclo di modellazione o risultare dall'assorbimento osseo. Dai dati forniti agli autori dal test con il TUNEL, i cambiamenti apportati non sono dovuti all'apoptosi, poiché questa non è stata individuata dal test. Viene fatto notare che questo dato può essere stato influenzato dalla mancanza di contatto tra le cellule cancerose e gli osteociti. Inoltre, viene indicata la possibilità che la riduzione della popolazione degli osteociti da parte delle cellule cancerose sia un meccanismo di sopravvivenza di queste ultime, per evitare l'inibizione della proliferazione e migrazione da parte degli osteociti. Un'indicazione importante viene fatta in merito allo stato di differenziazione: l'interazione tra gli osteociti e la neoplasia potrebbe variare dipendentemente dallo stadio di differenziazione nella quale si trovano gli osteociti.

Con questi esperimenti si vuole comprovare un legame tra la sensibilità meccanica degli osteociti e le secrezioni delle cellule cancerose; per caratterizzare ciò che succede quando c'è la compresenza cellulare tra gli osteociti e le cellule cancerose si necessita di ulteriori studi. Nella conclusione, gli autori affermano di aver mostrato come la stimolazione meccanica delle cellule cancerose aumenti la sensibilità meccanica degli osteociti e come due prove a favore di questo siano la formazione di dendriti e l'inibizione del gene OPG. Si è quindi a conoscenza di un legame meccanico tra le cellule del tessuto osseo e quelle cancerose.

4.3 Mechanical stress-induced cell death in breast cancer cells

Il nome completo dell'articolo è *Mechanical stress-induced cell death in breast cancer cells*^[60], di Satomi Takao, Minoru Taya e Cerwyn Chiew, pubblicato ad agosto 2019 sulla rivista *Biology Open*^[61] dell'editore *The Company of Biologists*^[62]. In questo studio viene fatta luce su come odiernamente sempre più studi su come la compressione delle cellule cancerose porti alla morte di esse vengano pubblicati, ma focalizza anche l'attenzione sul fatto che fino a questo momento molti scienziati si siano interessati a come far innescare il processo dell'apoptosi, mentre il loro studio si focalizza principalmente sull'innescamento della necrosi, per attrarre nel sito canceroso le cellule del sistema immunitario. Questa morte cellulare innescata da uno stress meccanico è denominata MSICD, cioè *mechanical stress-induced cell death*. All'inizio dell'elaborato gli autori descrivono la letteratura pregressa sull'argomento, facendo particolare attenzione al tipo di stress meccanico al quale le cellule vengono sottoposte e alla modalità con la quale è apportato il suddetto stress. Nella prima metà della discussione sullo stato dell'arte, viene illustrato come, da alcuni studi, si evinca il fatto che l'uso della compressione nella modalità quasi-statica, come viene usata negli articoli fino a quel momento descritti, potrebbe non essere adeguata a innescare il processo di apoptosi nelle cellule; anzi, potrebbe portare all'ipossia e quindi a rendere inefficaci i trattamenti anticancerogeni usuali. Per quanto concerne lo sforzo di taglio, studi hanno comprovato che nella sua forma laminare può portare alla morte cellulare per apoptosi, mentre nella forma oscillatoria non è altrettanto efficace. Al contrario, l'uso di un campo magnetico e di materiali magnetizzabili ha portato risultati positivi, trovando il massimo risultato nella combinazione del campo magnetico pulsato e dei medicinali antitumorali. Sempre sulla stessa linea, Domenech *et al.* nel 2013^[63] usarono delle nanoparticelle di ossido di ferro che, combinate con i recettori della crescita dell'epidermide, vengono incapsulate dentro agli endosomi e lisosomi, bloccando la crescita del tumore grazie a una corrente alternata. Anche l'uso di micro-dischi rotanti a bassa frequenza, così come le nanoparticelle, apporta stress di taglio con conseguente innescamento di apoptosi delle cellule cancerose. Per reiterare, grazie a questo resoconto sullo stato dell'arte, viene fornita l'informazione che usare sforzo normale o di taglio in piccole aree è un metodo per far innescare il processo di apoptosi. Questo succede poiché “gli impulsi meccanici applicati in piccole zone si propagano grazie al citoscheletro cellulare fino ad arrivare al nucleo, danneggiando il DNA e la struttura dei mitocondri, che è la chiave per innescare l'apoptosi”. In questa prima parte dell'articolo, gli autori illustrano come in letteratura ancora nessuno studio sia stato pubblicato riguardante la compressione in modalità dinamica (*oscillatory*), né sia focalizzato sul processo della necrosi; ciò considerato, gli autori hanno prodotto uno studio riguardante queste due peculiarità.

Per quanto riguarda l'esperimento in laboratorio, le due linee cellulari testate sono MDA-MB-231^[48] (linea metastatica) e BT-474^[64] (linea non metastatica). Le seconde sono cellule del tessuto della ghiandola mammaria di femmina umana affette da neoplasia; vengono conservate congelate. Per essere sicuri di identificare solo i danni apportati alla coltura da parte dello stress meccanico apportato in seguito, di ognuna delle due linee cellulari sono stati fatti tre tipi diversi di colture:

- “DMEM” viene chiamato il gruppo nel quale le cellule sono state trasferite nel DMEM senza FBS e che sono state tenute fuori dall'incubatore per la durata della stimolazione meccanica;
- “w/o MS” viene chiamato il gruppo nel quale, dopo il trasferimento nel DMEM, viene adagiato anche uno strato di gel d'agarosio di 2mm di spessore e concentrazione al 3%. Anche questo gruppo, come quello precedente, viene tenuto all'esterno dell'incubatore mentre il terzo gruppo viene stimolato meccanicamente;
- “w MS” è il gruppo trattato nella stessa maniera del gruppo precedente, ma il quale è stato sottoposto allo stimolo meccanico.

La coltura nel DMEM comprende anche (a parte il primo gruppo) 10% di FBS e viene mantenuta a 37°C e 5% di CO₂ (in incubatore, da dentro al quale viene rimossa nel momento del test). Prima della stimolazione meccanica, su queste cellule viene fatto un processo di *seeding*, fino ad ottenere la densità desiderata di $2.0 \cdot 10^4$ cellule/cm² (facendo dai 21 ai 25 passaggi di semina).

Nell'attuare il test, la macchina per la compressione si appoggia all'agarosio e, avendola impostata su un certo spostamento e frequenza, lo comprime di conseguenza. Il plateau d'appoggio sul gel è stato avvicinato a questo manualmente e, per non avere una forza troppo grande all'inizio, è stata impostata una equazione in funzione del tempo nel programma attuatore.

Due esperimenti sono stati fatti, il primo con uno spostamento maggiore e il secondo con uno spostamento minore. I loro dati sono:

- “Experiment 1”: spostamento α di 40, 60, 100 e 130 μm , con una variazione di forza tra 3.6 e 19.5 N; la frequenza era fissa a 30Hz e la durata da 210 a 300 s.
- “Experiment 2”: spostamento α di 10 μm con variabilità di durata, poiché il tempo è stato impostato a 30, 60, 90 s, mentre la frequenza a 0.1, 1, 5, 10 e 30 Hz, per controllare la dipendenza dalla frequenza; in questo caso, la forza variava da 0.1 a 1 N.

Dopo il carico meccanico, le colture sono state tinte con tre diversi marcatori. Il Propidium Iodide^[52] viene usato per individuare la necrosi. Il NucBlue^[65], un marcatore nucleare permanente, viene usato per individuare le cellule vive mediante una fluorescenza di colore blu. Infine, la Caspase-3/7^[66] viene usata per individuare fenomeni di apoptosi; questo prodotto è un substrato fluorescente che individua, legandosi, la presenza dell'enzima caspase-3/7, un enzima fondamentale durante l'apoptosi. Inoltre, in ogni gruppo è stato aggiunto un sottogruppo di cellule trattate con Etoposide^[67], usato come

controllo positivo del danno cellulare. Prima della valutazione, le cellule sono state fatte riposare nell'incubatore per 4 ore, un giusto compromesso tra l'evitare la sottostima del danno e la riparazione

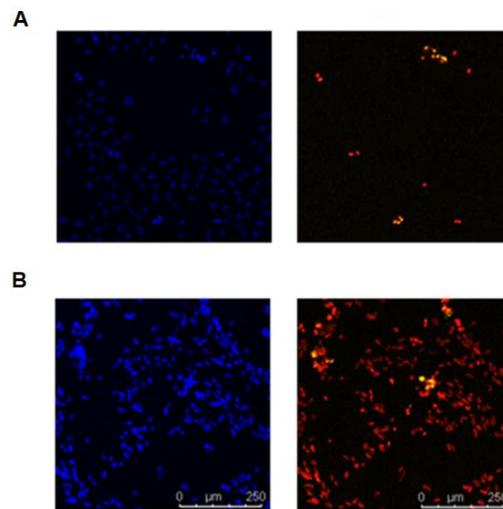


Figura 15 In blu è rappresentato il NucBlue, in giallo la Caspase-3/7 e in rosso il Propidium Iodide. Risultati delle colorazioni cellulari nella zona (A) centrale e (B) periferica. Si noti come nella zona centrale siano compresenti apoptosi e necrosi, mentre nella zona periferica sia maggiormente presente la necrosi (rosso). In blu viene rappresentata la vitalità delle cellule.

e proliferazione delle cellule danneggiate non drasticamente. Per processare meglio i dati ricevuti, gli autori hanno diviso in due aree i dischi sopra ai quali risiedeva la coltura, cioè un cerchio con $0\text{mm} \leq r < 10\text{mm}$ (“centro”) e una corona circolare con $10\text{mm} \leq r \leq 17.1\text{mm}$ (“periferia”). Il primo dato che viene fornito al lettore è il fatto che, a seguito della compressione meccanica ciclica, le cellule si siano danneggiate con conseguente necrosi e apoptosi; in particolare, nella regione centrale si osserva la compresenza di apoptosi e necrosi, mentre nella regione periferica è presente una dominanza necrotica (figura 15). Osservando invece la forma delle cellule nel primo esperimento, dopo il caricamento meccanico nella regione centrale sono risultate aventi forme normali, mentre nella regione periferica sono risultate più allungate; gli autori attribuiscono questo fenomeno alla diversità di carico, poiché nella regione periferica le cellule risultano sottoposte anche a sforzo di taglio (ipotesi fatta dagli autori). Questo, e i dati riguardanti la MSICD, portano a ipotizzare inoltre che esista una anche una dipendenza alla distanza dell'applicazione.

In Esperimento 1, all'inizio hanno testato la macchina per molto di più del tempo comunicato, constatando che, anche per la minima tensione, le cellule riportavano solo necrosi. Accorciando i tempi, si sono accorti che per un tempo di 300s la necrosi avveniva in più del 90% delle cellule (figura 16). Avendo osservato un comportamento simile in tutte e due le coltivazioni di differenti cellule,

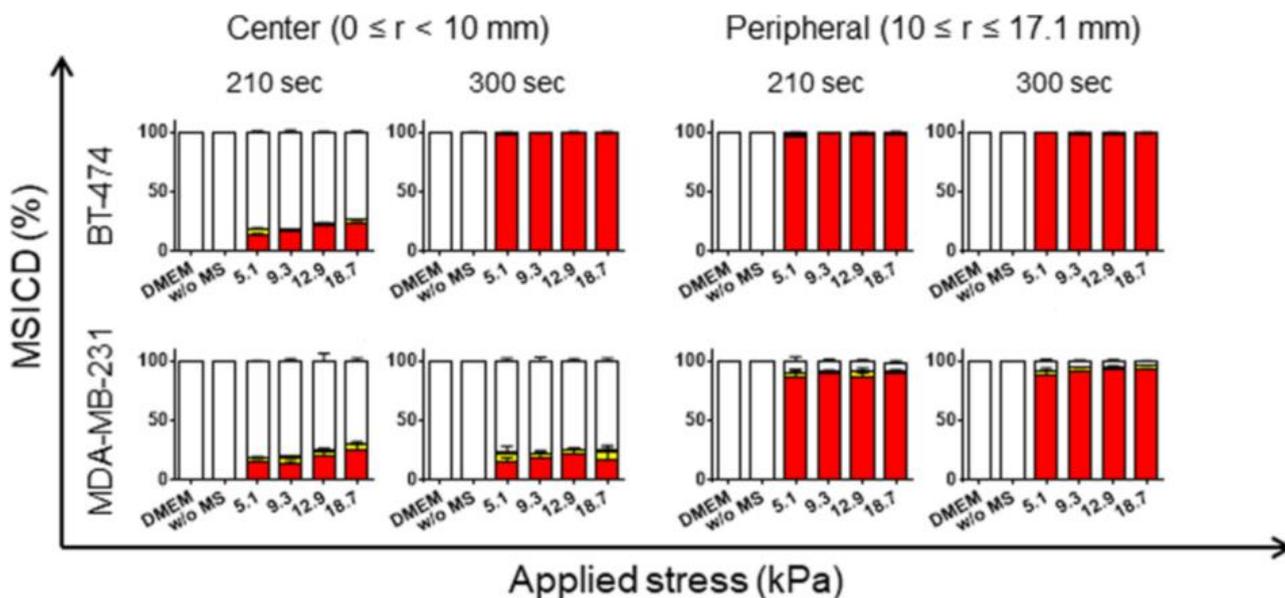


Figura 16 Dati relativi a Esperimento 1, ottenuti mediante colorante cellulare. In bianco vengono rappresentate le cellule vive, in verde la presenza di Caspase-3/7, in giallo la compresenza di Caspase-3/7 e Propidium Iodide e in rosso la presenza di Propidium Iodide. È mostrato come, a seguito di una stimolazione prolungata (300s), più del 90% delle cellule riulti soggetto a necrosi (rosso). Nella linea cellulare BT-474 la necrosi è più pronunciata che nella linea MDA-MB-231.

Takao *et al.* sono arrivati alla conclusione che la necrosi sia dipendente sia dal tempo che dalla forza applicata. Questo viene spiegato poiché anche il più piccolo valore dello spostamento è più grande della lunghezza cellulare media, mentre il più piccolo valore della forza è maggiore della forza che serve per rompere la membrana cellulare. In contrapposizione, l'apoptosi non risulta legata a una

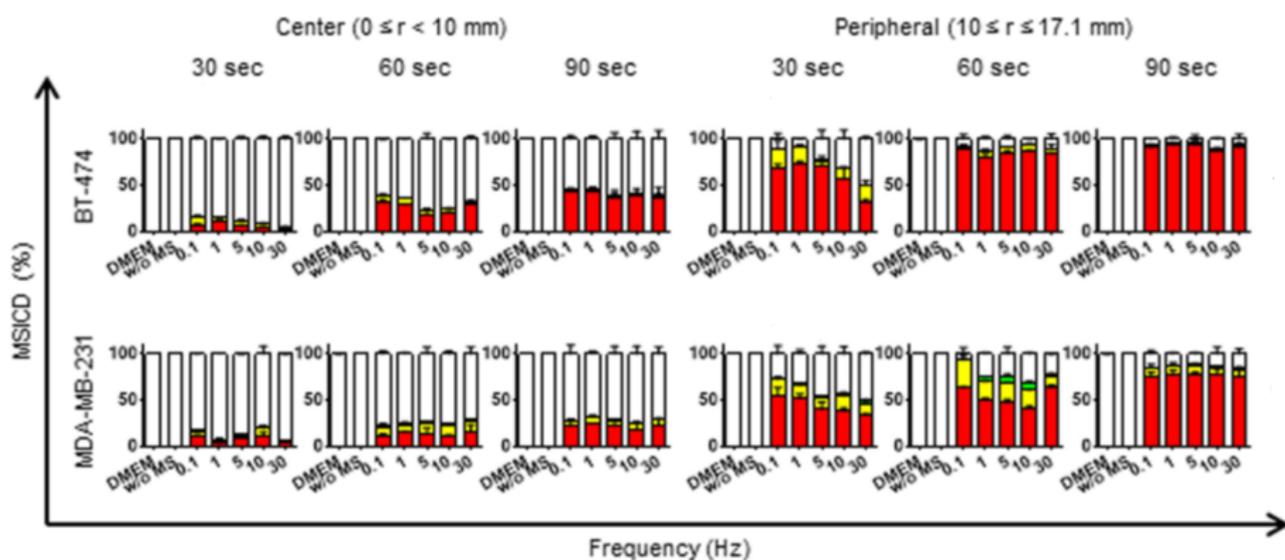


Figura 17 Dati relativi a Esperimento 2, ottenuti mediante colorante cellulare. In bianco vengono rappresentate le cellule vive, in verde la presenza di Caspase-3/7, in giallo la compresenza di Caspase-3/7 e Propidium Iodide e in rosso la presenza di Propidium Iodide. Rispetto a Esperimento 1, c'è molta più compresenza tra necrosi e apoptosi (giallo), riprovando che sono state innescate entrambe.

tempo- o forza- dipendenza; questa, al massimo, è stata riscontrata al 12.7%. Nei gruppi di controllo, cioè i gruppi “DMEM” e “w/o MS”, viene riscontrata sia attività della caspase sia una perdita della integrità della membrana cellulare, ma in percentuale sono inferiori al 1%, quindi questi fenomeni vengono ricondotti al naturale ciclo di vita e morte dei tessuti. La differenza nelle due linee cellulari si manifesta poiché nelle BT-474 la necrosi è più pronunciata che nelle altre; il fenomeno è dovuto al fatto che queste non sono metastatiche (a differenza delle MDA-MB-231), quindi non hanno espresse le molecole che facilitano l’adesione alla matrice extracellulare e al movimento. Le BT-474 rimangono quindi nello stesso luogo durante tutto il caricamento meccanico e così facendo accumulano stress a un livello tale da risultare letale.

L’Esperimento 2 presenta spostamenti e tempi più contenuti, con consecutivi risultati: necrosi e apoptosi sono compresenti (figura 17), ma la seconda è presente dalle 8 alle 10 volte in più rispetto al primo esperimento. Da ciò si evince come queste condizioni siano più ideali, poiché per avere una risposta antitumorale da parte del sistema immunitario è importante innescare sia l’apoptosi che la necrosi. I risultati ottenuti a 1.0kPa sono migliori dei risultati ottenuti da Cheng *et al.* nel 2009^[68]; nel loro studio applicarono compressione statica di 1.5kPa per 17 ore, mentre qui la compressione applicata è ciclica per 60 secondi. Questo porta a evincere il fatto che una compressione dinamica, anche se di minore intensità e con durata sensibilmente inferiore, è più efficace nel causare danni alle cellule di una statica più intensa per un periodo prolungato. Vengono riportati dati singolari per quanto riguarda la dipendenza dalla frequenza nell’Esperimento 2: il danno alle cellule decresce con l’aumentare della frequenza. Gli autori hanno ricondotto questo a un malfunzionamento della macchina, poiché ad alte frequenze c’è un ritardo nell’azione del piezo-attuatore, il che risulta in un decremento della forza. In generale, è stato riscontrato che la compressione ciclica è un metodo appropriato per indurre necrosi e apoptosi e che queste, nelle linee cellulari scelte, si presentano diversamente nelle due regioni della coltura. Viene osservato inoltre come la MSICD sia dipendente sia dal tempo che dalla forza applicata nella compressione, mentre la frequenza non la influenza.

Conclusioni e sviluppi futuri

Dagli articoli esaminati emerge una effettiva correlazione tra la stimolazione meccanica (prevalentemente compressione) e una regressione di qualsiasi sorta della massa tumorale. Il primo lavoro, tra quelli presentati, ha contribuito enormemente a gettare le basi nello stato dell'arte per tutti i lavori fatti a suo seguito, dimostrando chiaramente come, sottoponendo un arto affetto da tumore di seconda generazione a compressione meccanica, la malattia venga espressa solo in una quantità limitata di campioni. Osservando il fenomeno dall'altro lato, questo significa che il resto dei campioni è stato sottoposto a un processo tale per cui è avvenuta una regressione della malattia. Gli altri due articoli presentati esplorano le possibili implicazioni in due diverse direzioni, sia verso il contrastare la malattia allo stadio metastatico, sia verso la cura della malattia quando ancora è localizzata nel tessuto mammario. Le scoperte documentate nel primo implicano una connessione tra lo stimolo meccanico e i cambiamenti nelle cellule di cancro alla mammella apportati da esso; queste consistono nell'influenza sulla sensibilità degli osteociti e i risultati comprendono l'aumento della formazione dei dendriti e un minore riassorbimento degli stessi osteociti da parte degli osteoclasti, uno dei principali effetti delle metastasi ossee. Il secondo articolo riguarda l'innescare della combinazione di apoptosi e necrosi con l'obiettivo di stimolare una risposta immunitaria da parte dell'organismo; viene comprovato che è un metodo più efficace in neoplasie non metastatiche, poiché queste non esprimono fattori per la mobilità e, rimanendo stabili nello stesso luogo, accumulano stress meccanico a un livello tale da risultare letale.

Questi studi e le loro implicazioni offrono molti spunti per indagini future, poiché ci sono le basi per ulteriori studi per metodi adiuvanti sia per tumori localizzati nel tessuto mammario, sia per tumori in fase metastatica, per migliorare la qualità della vita delle pazienti. Per far sì che questi studi un giorno si tramutino in una cura effettiva, la sperimentazione su pazienti è un passo fondamentale. In questa, bisogna disegnare dei macchinari e dei protocolli che si avvicinino il più possibile a ciò che è stato sperimentato in laboratorio, senza tuttavia sfociare in pratiche troppo invasive o dispendiose di tempo, energia e denaro.

Per una possibile applicazione anti-metastatica, partendo dal presupposto che le metastasi ossee sono tra le più frequenti nel cancro alla mammella, si potrebbero teorizzare degli esercizi fisici mirati per aumentare la compressione del tessuto nella quale è presente la metastasi; per aiutare questo processo ci si potrebbe aiutare anche con macchinari e attrezzi da palestra, quali la pressa meccanica e i pesi. Per quanto riguarda le neoplasie non ancora metastatiche, queste hanno molte più incognite riguardanti l'attuazione di un trattamento adiuvante con queste basi; il primo ostacolo che si incontra è indubbiamente la regione alla quale la malattia si trova e la sua profondità. Nondimeno, si possono

sviluppare tecniche di massaggio e manipolazione che imprimano, esternamente, le stesse stimolazioni. Queste tecniche possono essere pensate sia attuate da un operatore, sia implementate da un macchinario fatto appositamente con questo obiettivo.

Bibliografia

- [1] WHO, «Cancer Key Facts», <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] WHO, «Cardiovascular diseases», <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cardiovascular-diseases>.
- [3] WHO, «Cancer Overview», <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer>.
- [4] *World Cancer Research Fund*, «Breast cancer statistics», <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>.
- [5] AIOM, «I Numeri del Cancro in Italia 2018», https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/10/2018_NumeriCancro-operatori.pdf.
- [6] AIOM, «Linee Guida Neoplasie della Mammella Edizione 2019», https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/10/2019_LG_AIOM_Mammella.pdf.
- [7] Campbell M K, Farrell S O e McDougal O M, «*Biochimica*», 5a Edizione 2019. Edises.
- [8] *Ministero della Salute*, «I numeri del cancro in Italia 2019, il rapporto Aiom-Airtum», http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=3897.
- [9] Puliti D, Miccinesi G, Collina N, De Lisi V, Federico M *et al.*, «Effectiveness of service screening: a case–control study to assess breast cancer mortality reduction», *British Journal of Cancer*, vol. 99, n. 3, pagg. 423–427, ago. 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604532.
- [10] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V *et al.*, «Breast-Cancer Screening - Viewpoint of the IARC Working Group», *The New England Journal of Medicine*, vol. 372, n. 24, pagg. 2353–2358, giu. 2015, doi: 10.1056/NEJMSr1504363.
- [11] *Regione Emilia-Romagna*, «Screening mammografico Emilia-Romagna», <https://salute.regione.emilia-romagna.it/screening/tumori-femminili/domande-e-risposte/screening-mammografico>.
- [12] Puliti D, Duffy S W, Miccinesi G, De Koning H, Lynge E *et al.*, «Overdiagnosis in Mammographic Screening for Breast Cancer in Europe: A Literature Review», *Journal of Medical Screening*, vol. 19, n. 1 supplement, pagg. 42–56, set. 2012, doi: 10.1258/jms.2012.012082.

- [13] *AIRC*, «La stadiazione»,
<https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/come-affrontare-la-malattia/stadiazione>.
- [14] *Fondazione Umberto Veronesi*, «Tumore al seno: gli stadi e le terapie per ciascuno di essi»,
<https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/lesperto-risponde/tumore-al-seno-quali-sono-gli-stadi-e-le-terapie-per-ciascuno-di-essi>.
- [15] *Fondazione Umberto Veronesi*, «I carcinomi duttale e lobulare in situ sono tumori maligni?», <https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/lesperto-risponde/i-carcinomi-duttale-e-lobulare-in-situ-sono-tumori-maligni>.
- [16] Moo T-A, Sanford R, Dang C, Morrow M, «Overview of Breast Cancer Therapy», *PET Clinics*, vol. 13, n. 3, pagg. 339–354, lug. 2018, doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006.
- [17] *AIRC*, «Chemioterapia»,
<https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/chemioterapia>.
- [18] Harbeck N e Gnant M, «Breast cancer», *The Lancet*, vol. 389, n. 10074, pagg. 1134–1150, mar. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- [19] *Fondazione Umberto Veronesi*, «Il farmaco antitumore che va a colpo sicuro»,
<https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/oncologia/il-farmaco-antitumore-che-va-colpo-sicuro>.
- [20] *AIRC*, «Radioterapia»,
<https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/radioterapia>.
- [21] Recht A, Gray R, Davidson N E, Fowbie B L, Solin L J, *et al.*, «Locoregional failure 10 years after mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen without irradiation: experience of the Eastern Cooperative Oncology Group», *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, n. 6, pagg. 1689–1700, giu. 1999, doi: 10.1200/JCO.1999.17.6.1689.
- [22] Overgaard M, Jensen M-B, Overgaard J, Hansen P S, Rose C, *et al.*, «Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial», *The Lancet*, vol. 353, n. 9165, pagg. 1641–1648, mag. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(98)09201-0.
- [23] Tinterri C, Gatzemeier W, Costa A, Gentilini M A, Zanini V, *et al.*, «Breast-Conservative Surgery With and Without Radiotherapy in Patients Aged 55–75 Years With Early-Stage Breast Cancer: A Prospective, Randomized, Multicenter Trial Analysis After 108 Months of

Median Follow-up», *Annals of Surgical Oncology*, vol. 21, n. 2, pagg. 408–415, feb. 2014, doi: 10.1245/s10434-013-3233-x.

- [24] *AIRC*, «La terapia ormonale dei tumori», <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/la-terapia-ormonale-dei-tumori>.
- [25] Hickman J A, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, van der Kuip H, «Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo», *Biotechnology Journal*, vol. 9, n. 9, pagg. 1115–1128, 2014, doi: 10.1002/biot.201300492.
- [26] Ghajar C M e Bissell M J, «Tumor Engineering: The Other Face of Tissue Engineering», *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, n. 7, pagg. 2153–2156, lug. 2010, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0135.
- [27] Xu W, Hu X e Pan W, «Tissue Engineering Concept in the Research of the Tumor Biology», *Technology in Cancer Research & Treatment*, vol. 13, n. 2, pagg. 149–159, apr. 2014, doi: 10.7785/tcrt.2012.500363.
- [28] *AIOM*, S. Scagnoli, «Targets and microenvironment: What do we know?», https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/01/20190128RM_21_Scagnoli.pdf.
- [29] *AIRC*, «Metastasi: le domande più frequenti», <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/cose-il-cancro/metastasi>.
- [30] *Emory Winship Cancer Institute*, «Seed and Soil Theory», <https://www.cancerquest.org/node/6228>.
- [31] Hassanzadeh P, Atyabi F e Dinarvand R, «Tissue engineering: Still facing a long way ahead», *Journal of Controlled Release*, vol. 279, pagg. 181–197, giu. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.04.024.
- [32] Guller A E, Grebenyuk P N, Shekhter A B, Zvyagin A V, Deyev S M, «Bioreactor-Based Tumor Tissue Engineering», *Acta Naturae*, vol. 8, n. 3, pagg. 44–58, lug.-set. 2016, doi: 10.32607/20758251-2016-8-3-44-58
- [33] Lovecchio J, Gargiulo P, Vargas Luna J L, Giordano E, Sigurjónsson Ó E, «A standalone bioreactor system to deliver compressive load under perfusion flow to hBMSC-seeded 3D

- chitosan-graphene templates», *Scientific Reports*, vol. 9, nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53319-7.
- [34] Hutmacher D W, «Biomaterials offer cancer research the third dimension», *Nature Materials*, vol. 9, n. 2, Art. n. 2, feb. 2010, doi: 10.1038/nmat2619.
- [35] Hughes C S, Postovit L M, e Lajoie G A, «Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture», *PROTEOMICS*, vol. 10, n. 9, pagg. 1886–1890, 2010, doi: 10.1002/pmic.200900758.
- [36] Stroock A D e Fischbach C, «Microfluidic Culture Models of Tumor Angiogenesis», *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, n. 7, pagg. 2143–2146, lug. 2010, doi: 10.1089/ten.tea.2009.0689.
- [37] Fu X T e Kim S M, «Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications», *Marine Drugs*, vol. 8, n. 1, pagg. 200–218, gen. 2010, doi: 10.3390/md8010200.
- [38] Zucca P, Fernandez-Lafuente R e Sanjust E, «Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization», *Molecules*, vol. 21, n. 11, pag, 1577, nov. 2016, doi: 10.3390/molecules21111577.
- [39] Ricard-Blum S, «The Collagen Family», *Cold Spring Harbor Perspettive in Biology*, vol. 3, n. 1, gen. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- [40] Shoulders M D e Rainers R T, «Collagen Structure and Stability», *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, pagg. 929-958, 2009, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [41] Nocera A D, Comín R, Salvatierra N A, Cid M P, «Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering», *Biomedical Microdevices*, vol. 20, n. 2, pag. 26, feb. 2018, doi: 10.1007/s10544-018-0270-z.
- [42] Das A e Pamu D, «A comprehensive review on electrical properties of hydroxyapatite based ceramic composites», *Materials Science and Engineering: C*, vol. 101, pagg. 539–563, ago. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.077.
- [43] Mir M, Ahmed N e ur Rehman A, «Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 159, pagg. 217–231, nov. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.038.

- [44] Lynch M E, Brooks D, Mohanan S, Lee M J, Polamraju P, *et al.*, «In Vivo Tibial Compression Decreases Osteolysis and Tumor Formation in a Human Metastatic Breast Cancer Model», *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 28, n. 11, pagg. 2357–2367, nov. 2013, doi: 10.1002/jbmr.1966.
- [45] *American Society for Bone and Mineral Research*, «Journal of Bone and Mineral Research», <https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/journal/15234681>.
- [46] «The American Society for Bone and Mineral Research», <https://www.asbmr.org/Default.aspx>.
- [47] «Cornell University». <https://www.cornell.edu/>.
- [48] ATCC, «MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)», https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/htb-26.aspx?geo_country=it#.
- [49] *The Leeds Histology Guide*, «What is H&E?», https://www.histology.leeds.ac.uk/what-is-histology/H_and_E.php.
- [50] *Thermo Fisher Scientific*, «Lab Vision™ Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Ab-1, Mouse Monoclonal Antibody», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/MS-1768-R7>.
- [51] *Thermo Fisher Scientific*, «Calcein, AM, cell-permeant dye», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1430>.
- [52] *Thermo Fisher Scientific*, «eBioscience™ Propidium Iodide», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/BMS500PI>.
- [53] Wang W, Sarazin B A, Kornilowicz G, Lynch M E, «Mechanically-Loaded Breast Cancer Cells Modify Osteocyte Mechanosensitivity by Secreting Factors That Increase Osteocyte Dendrite Formation and Downstream Resorption», *Frontiers in Endocrinology*, vol. 9, lug. 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00352.
- [54] «Frontiers in Endocrinology», <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology>.
- [55] Zhao S, Kato Y, Zhang Y, Harris S, Ahuja S S, Bonewald L F, «MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast Formation and Activation», *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, n. 11, pagg. 2068–2079, 2002, doi: 10.1359/jbmr.2002.17.11.2068.
- [56] Bonewald L F, «Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4», *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, vol. 17, n. 1, pagg. 61–65, feb. 1999,

doi: 10.1007/s007740050066.

- [57] *Thermo Fisher Scientific*, «Phalloidin Conjugates For Staining Actin», <https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/cytoskeleton/phalloidin-and-phalloidin-conjugates-for-staining-actin.html>.
- [58] *Sigma-Aldrich*, «DAPI», <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9542>.
- [59] *Thermo Fisher Scientific*, «Click-iT™ TUNEL Colorimetric IHC Detection Kit», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10625>.
- [60] Takao S, Taya M e Chiew C, «Mechanical stress-induced cell death in breast cancer cells», *Biology Open*, vol. 8, n. 8, ago. 2019, doi: 10.1242/bio.043133.
- [61] «Biology Open Homepage», <https://bio.biologists.org/>.
- [62] «The Company of Biologists», <https://www.biologists.com/>.
- [63] Domenech M, Marrero-Berrios I, Torres-Lugo M, Rinaldi C, «Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields», *ACS Nano*, vol. 7, n. 6, pagg. 5091–5101, giu. 2013, doi: 10.1021/nn4007048.
- [64] *ATCC*, «BT-474 (ATCC® HTB-20™)», https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-20.aspx?geo_country=it#generalinformation.
- [65] *Thermo Fisher Scientific*, «NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Hoechst 33342)», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37605>.
- [66] *Thermo Fisher Scientific*, «CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent», <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423>.
- [67] *Humanitas Research Hospital*, «Etoposide - Humanitas», <https://www.humanitas.it/enciclopedia/principi-attivi/antineoplastici-antitumorali/etoposide>.
- [68] Cheng G, Tse J, Jain R K, Munn L L, «Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells», *PLOS ONE*, vol. 4, n. 2, pag. e4632, feb. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004632.