



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

Corso di Laurea Magistrale Interdipartimentale in
Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche

Caratterizzazione e valutazione morfologica di costrutti epidermici umani coltivati *in vitro* come modello per studi inerenti la Terapia per Cattura Neutronica nel Boro (BNCT)

Relatore:

Dott.ssa Federica Riva

Correlatori:

Dott.ssa Patrizia Sommi

Dott.ssa Cinzia Ferrari

Tesi di Laurea Magistrale in
Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche

Francesco Iacullo

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

GLOSSARIO

ABSTRACT

1 INTRODUZIONE	1
1.1 La cute umana	1
1.2 Morfologia epidermide.....	4
1.2.1 Proliferazione e differenziamento cellulare dell'epidermide umana	9
1.2.2 Tight junctions.....	12
1.3 Modelli biologici sperimentali	15
1.3.1 Modelli 3D.....	17
1.3.2 Costrutti cutanei ingegnerizzati	18
1.3.3 Sostituti dermici	22
1.3.4 Sostituti epidermici	24
1.4 Radiazioni ultraviolette (UV)	29
1.5 Terapia per cattura neutronica nel boro (BNCT).....	35
1.5.1 Vettori veicolanti il boro	37
1.5.2 Morte cellulare indotta da BNCT	39
1.5.3 Aspetti storici della BNCT.....	40
2 STATO DELL' ARTE	41
2.1 SkinEthic™ RHE come primo modello cutaneo radiobiologico.....	42
2.2 Studi inerenti alla BNCT sviluppati in Italia.....	43
3 SCOPO DEL LAVORO	45
4 MATERIALI E METODI	48
4.1 Costrutto SkinEthic™ RHE.....	48
4.2 Incubazione e assorbimento della borofenilalanina (BPA)	49
4.3 Irraggiamento e dose di radiazioni assorbite	49
4.4 Allestimento e preparazione dei campioni RHE su vetrini portaoggetti	50
4.5 Colorazione ematosilina-eosina.....	52

4.6	Acquisizione ed elaborazione delle immagini	53
4.7	Immunoistochimica	55
4.7.1	Saggio immunoistochimico per la rivelazione dell'espressione delle citocheratine	55
4.7.2	Saggio immunoistochimico per la rivelazione dell'espressione dell' involucrina	57
4.7.3	Saggio immunoistochimico per la rivelazione dell'espressione della filaggrina	58
5	RISULTATI	60
5.1	Valutazione morfologica dei costrutti SkinEthic™ RHE	60
5.2	Valutazione e analisi delle alterazioni isto-architetture dei costrutti RHE	69
5.2.1	Analisi morfo-istologiche dei campioni RHE controllo al tempo T7	82
5.3	Analisi dei costrutti RHE irraggiati con fotoni	84
6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	90
7	BIBLIOGRAFIA	97

GLOSSARIO

- **3D** Tridimensionale
- **6-4 PP** (*Pyrimidine-Pyrimidone (6–4) Photoproducts*): 6-4 pirimidina-pirimidone
- **BEE** barriera ematoencefalica
- **BER** (*Base Excision Repair*): riparazione per escissione di basi
- **BNCT** (*Boron Neutron Capture Therapy*): terapia per cattura neutronica nel boro
- **BPA** Borofenilalanina
- **CDK** (*Cyclin-Dependent Kinase*): chinasi ciclina dipendente
- **CEA** Cellule epiteliali autologhe
- **CPD** (*Cyclobutane Pyrimidine Dimers*): dimeri di pirimidine
- **DAB** 3,3'- diamminobenzidina
- **DOPA** Diidrossifenilalanina
- **DSB** (*Double-Strand Break*): danni alla doppia elica
- **DSG1** Caderina desmosomiale 1
- **FITC** (Fluorescein Isothiocyanate): fluorescina isotiocianato
- **Gy**: Gray
- **IHC** (*Immunohistochemistry*): saggio immunoistochimico
- **IL1- α** (*Interleukin-1 α*): Interleuchina-1 α
- **IR** Radiazione infrarossa
- **JAMs**: (*Junctional adhesion molecules*): Molecole di adesione giunzionale
- **LAT1** Trasportatore degli L-amminoacidi
- **LET** (*Linear Energy Transfer*): Energia di trasferimento lineare
- **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase*): Proteine Chinasi Attivate dai Mitogeni
- **MCR** (*Melanocortine receptor*): Recettore delle melanocortine
- **MITF** (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*): Fattore di trascrizione associato alla microftalmia
- **MMP** (*Matrix Metalloproteinase*): Metalloproteasi della Matrice
- **MSH** Ormone melanocita-stimolante

- **MTT** (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) : Bromuro di 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio
- **NER** (*Nucleotide Excision Repair*): riparazione per escissione di nucleotidi (NER)
Nucleotide Excision Repair
- **PBS** (*Phosphate Buffer Saline*)
- **RHE** (*Reconstructed Human Epidermis*): costruito epidermico umano
- **ROS** (*Reactive Oxygen Species*): Radicali liberi dell'ossigeno
- **SGM**: *SkinEthic Growth Medium*
- **SMM**: *SkinEthic Maintenance Medium*
- **SSB** (*Single-Strand Break*): rotture al singolo filamento
- **TA**: (*Transit-Amplifying cells*)
- **TAOrMINA** Trattamento Avanzato d'Organi Mediante Irraggiamento Neutronico e Autotrapianto
- **TBS** (*Tris Buffered Saline*)
- **TGFβ**: (*Transforming growth factor beta*): Fattore di crescita trasformante beta
- **TJs** (*tight junctions*): giunzioni strette
- **TRP** (*Tyrosinase-related protein*): Proteina correlata alla tirosinasi
- **UV** Ultravioletto
- **ZO**: (*zonula occludens*): Giunzioni occludenti

ABSTRACT

SkinEthic™ RHE (epidermide umana ricostruita) è un equivalente epidermico progettato e sviluppato presso i laboratori EpiSkin in Francia (Nizza). I dati tecnici e le schede di sicurezza prodotti dal laboratorio francese definiscono il modello epidermico come “un'epidermide umana ricostruita *in vitro* da cheratinociti umani coltivati su una membrana di 0,5 cm² inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido, in un mezzo chimicamente definito”. Attualmente è disponibile in commercio e convalidato come modello *in vitro* completo, sostitutivo alla sperimentazione animale, per la verifica di test dermatologici associati alla fototossicità e irritabilità. Inoltre, rappresenta uno dei modelli idonei per la veicolazione di farmaci e altri xenobiotici. Proprio per l'elevata somiglianza morfologica e isto-architeturale con l'epidermide umana, SkinEthic™ RHE è stato selezionato come modello più adatto per condurre analisi relative agli effetti determinati dalla Terapia di Cattura Neutronica nel Boro (BNCT).

Si tratta di tipo di radioterapia binaria basata sull'irraggiamento con neutroni epitermici di cellule neoplastiche precedentemente arricchite con un isotopo stabile del boro non radioattivo, il ¹⁰B. La reazione di cattura neutronica del boro permette il rilascio di due particelle ionizzate (α , ⁷Li) che disperdono la loro energia entro un raggio paragonabile al diametro della cellula tumorale, causando un danno irreversibile al DNA e permettendo di distruggere selettivamente il tessuto tumorale lasciando intatte le cellule sane circostanti. La BNCT è una radioterapia con ampie potenzialità nell'ambito oncologico. Sono in corso studi di ottimizzazione delle varie fasi sperimentali e risulta ancora necessario il superamento di alcuni limiti, come l'insorgenza di possibili danni a livello cutaneo, provocati dalle radiazioni.

Lo scopo di questa tesi è stato valutare gli effetti della radioterapia BNCT sul costruito SkinEthic™ RHE, utilizzato come modello tridimensionale epidermico *in vitro*. Sono stati analizzati l'aspetto morfologico ed isto-architeturale dei campioni sottoposti ad irraggiamento neutronico in assenza ed in presenza di BPA, confrontandoli con la condizione del controllo non irraggiato.

Le analisi morfologiche sono state eseguite, dopo colorazione ematossilina eosina, avvalendosi dell'osservazione al microscopio ottico in luce trasmessa.

Sono stati eseguiti saggi immunohistochimici per la rivelazione di proteine tipiche del processo di differenziamento terminale dei cheratinociti. Le pan-citocheratine (proteine presenti nel citoplasma di tutti i cheratinociti) sono state evidenziate con una colorazione di reazione marrone, risultato della reazione sviluppata dal cromogeno DAB, a cui è seguita l'osservazione con ingrandimento al 20X al microscopio ottico. La rivelazione di involucrina e filaggrina (proteine espresse nei cheratinociti nello strato spinoso più superficiale e nello strato granuloso) è stata effettuata utilizzando un anticorpo primario specifico ed un anticorpo secondario coniugato con la fluoresceina isotiocianato (FITC), che fluoresce nel verde. I nuclei cellulari sono stati osservati mediante una colorazione con Hoechst33258 che emette una fluorescenza nel blu.

I risultati ottenuti su sezioni del costrutto SkinEthic™ RHE mostrano che il trattamento BNCT ha determinato effetti biologici avversi, caratterizzati da un'alterazione della tipica morfologia cellulare epidermica. Non sono stati riscontrati gli stessi danni in tutti i campioni trattati e a causa dell'elevata variabilità di ciascun costrutto è difficile ottenere un valore minimo di radiazione neutronica incorporata a cui poter associare il manifestarsi di un danno biologico. Il seguente progetto di tesi si inserisce in un contesto più ampio, un progetto di ricerca multidisciplinare che si prefigge di ottimizzare l'applicazione clinica, in ambito oncologico, della BCNT per il trattamento di tumori disseminati o infiltrativi. Studi futuri, come l'ambizioso progetto di sviluppo di un modello dosimetrico da utilizzare per esprimere la dose di radiazione neutronica fotone equivalente, saranno necessari per apportare un maggiore numero di dati sperimentali al fine di raggiungere l'obiettivo finale.

1 INTRODUZIONE

1.1 La cute umana

La cute è un organo complesso, ricopre l'intera superficie corporea e svolge diverse funzioni, fra cui la principale è formare una barriera fisica tra il corpo umano e l'ambiente circostante: si tratta della prima linea di difesa dell'organismo contro eventuali aggressioni esterne da parte di agenti patogeni e microorganismi. Essa, infatti, permette e allo stesso tempo limita il passaggio da e verso l'organismo di acqua ed elettroliti ai fini di mantenere il giusto equilibrio idrico dei tessuti e di altre sostanze che conferiscono protezione contro agenti patogeni, agenti tossici e radiazioni ultraviolette. Alla funzione di difesa dai danni fisico-chimici si affianca quella di ricezione degli stimoli tattili, termici e dolorifici provenienti dall'esterno. La cute riveste l'importante ruolo di termoregolazione grazie alla presenza delle ghiandole sudoripare e di una fitta rete di capillari: la vasodilatazione, provoca un incremento del flusso ematico locale che favorisce la cessione di calore all'esterno; viceversa, la vasocostrizione, riducendo la quantità di sangue in transito, preserva le dispersioni termiche. Quest'organo provvede inoltre alla produzione di vitamina D, utile al mantenimento di calcio e fosforo nelle ossa. Per le molteplici funzionalità che riveste, i danni provocati da una perdita ingente di tessuto possono causare gravi alterazioni sistemiche e portare alla morte del paziente. La cute è anatomicamente costituita da tre strati istologici, diversi per localizzazione, struttura e proprietà. Dalla superficie, scendendo man mano in profondità si trova il tessuto epiteliale chiamato epidermide, il tessuto connettivo o derma e l'ipoderma. Completano la struttura della pelle i cosiddetti annessi cutanei, che comprendono ghiandole, apparato circolatorio e terminazioni nervose.

L'epidermide, di origine ectodermica, è lo strato cutaneo più esterno e funge essenzialmente da barriera, impedendo da un lato la penetrazione di sostanze estranee e microorganismi e dall'altro la perdita di acqua ed elettroliti dall'organismo. Questo strato non è vascolarizzato, riceve nutrimento per diffusione dal derma tramite la giunzione dermo-epidermica, una membrana che regola gli scambi tra le due regioni e ne permette una migliore aderenza (**Ambrosi et al (2004).Anatomia dell'uomo. Edizione Ermes. s.d.**).

Il derma è un tessuto connettivo organizzato in due strati principali: lo strato papillare, più superficiale costituito da tessuto connettivo lasso in cui ha sede il plesso microvascolare, e lo strato reticolare, più profondo costituito da tessuto connettivo denso irregolare, sede dei vasi sanguigni di maggior calibro. Il derma è estremamente acidofilo per la presenza di numerose fibre collagene proteiche che, essendo basiche, assumono il colorante acido eosina, conferendo l'aspetto roseo a tutto il derma dopo colorazione. Questo tessuto connettivo è caratterizzato da un polimorfismo cellulare, dove i fibroblasti ne rappresentano le cellule principali, capaci di sintetizzare e secernere i componenti della matrice extracellulare, tra cui varie macromolecole (collagene, elastina, fibronectina, decorina, tenascina, laminina e proteoglicani) che conferiscono alla cute forza tensile. Associati al derma, nello strato reticolare più profondo del connettivo denso, si trovano anche gli annessi cutanei, rappresentati dai follicoli piliferi e dalla radice del pelo. Il pelo è costituito da un'associazione di cellule che possiedono una certa staminalità e si trovano a livello del bulge, al di sotto della ghiandola sebacea pilifera. Queste cellule servono per il mantenimento delle nicchie di staminalità dell'epidermide. Al pelo si associano le ghiandole sebacee che sintetizzano e secernono (con secrezione olocrina) il sebo, una sostanza oleosa che si distribuisce su tutto il pelo all'interno dei follicoli e che ha la funzione di lubrificare la superficie epidermica. Le ghiandole sebacee possono essere localizzate anche nel derma profondo indipendentemente dal pelo. Le ghiandole sudoripare esocrine del derma rilasciano sulla superficie cutanea il sudore acquoso, il quale interviene nel processo di mantenimento della temperatura corporea. Inoltre, vi sono le ghiandole sudoripare

apocrine, localizzate nella cute di ascelle e perineo, che secernono un sudore ricco di proteine (X. Zhang, Yin, e Zhang 2019).

L'ipoderma è direttamente a contatto con il derma e tessuto adiposo. Questo strato è costituito soprattutto da tessuto connettivo ed è particolarmente ricco di adipociti, le cellule preposte alla biosintesi dei grassi. La presenza di questa tipologia di cellule permette la funzione di isolante termico e di riserva energetica. Nell'ipoderma hanno origine i follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare che ricevono nutrimento e cedono i loro prodotti di scarto («ISTOLOGIA di Monesi» s.d.).

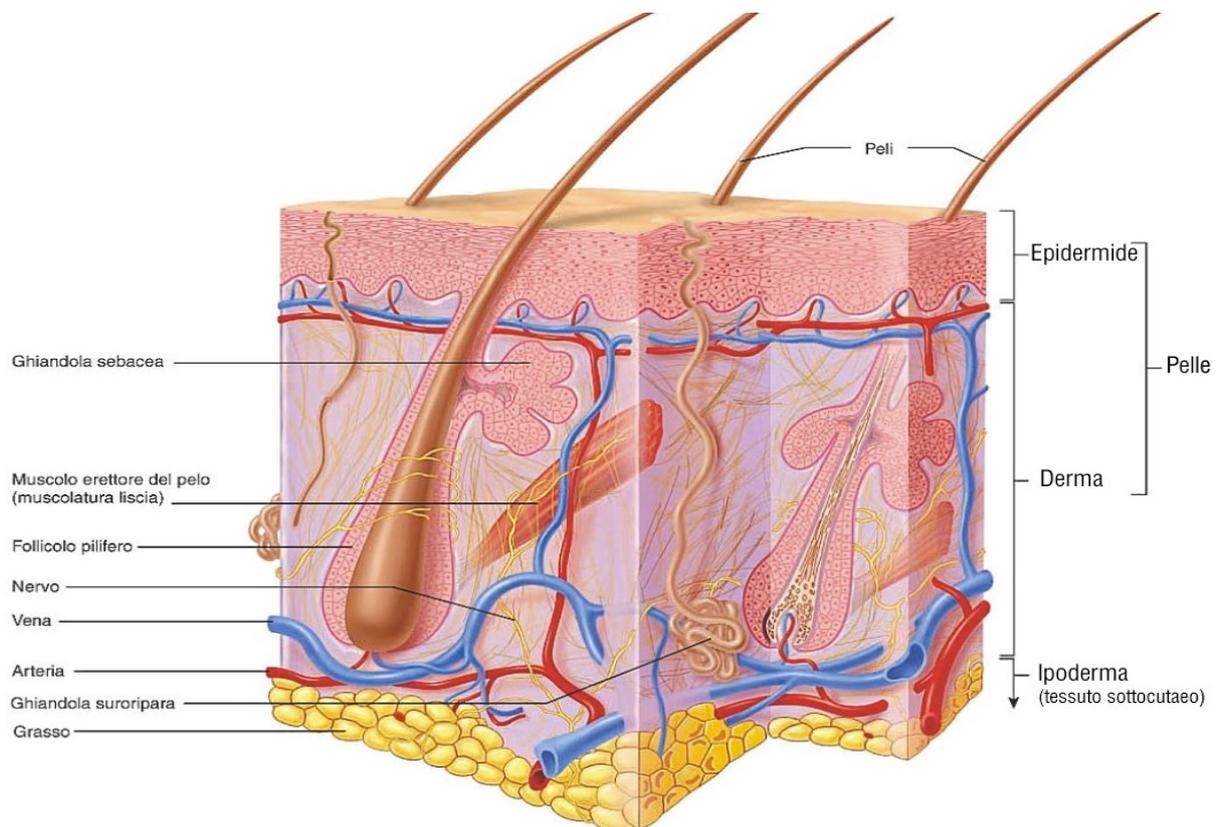


Fig.1 Rappresentazione schematica della cute umana (Martini F.H. et al. 2006, *Anatomia Umana*, Napoli, EdiSES- VI edizione)

1.2 Morfologia epidermide

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato cheratinizzato, spesso in media 0.2 mm, in continuo rinnovamento, costituito da quattro tipi di cellule: i cheratinociti, i melanociti, le cellule di Langherans e le cellule di Merkel. I cheratinociti sono le vere e proprie cellule epiteliali più rappresentate, caratterizzate dall'espressione di citocheratine e da una stretta connessione intercellulare mediata da dispositivi giunzionali come desmosomi e *tight junctions*, che creano un'efficace barriera verso le sollecitazioni meccaniche e il passaggio intercellulare di sostanze. Sono cellule con elevata capacità proliferativa e differenziativa, pertanto sono responsabili del rapido *turnover* tissutale e della formazione dello strato corneo. La differenziazione è un processo complesso: da una cellula staminale a livello dello strato basale si ottiene una cellula destinata a differenziarsi in cheratinociti adulti che man mano si spostano verso la superficie. Il diverso grado di differenziazione e maturazione dei cheratinociti determina la formazione di quattro distinte porzioni di cellule stratificate. Partendo dallo strato più profondo, il quale poggia sulla membrana basale, a quello più superficiale, è possibile distinguere: lo strato basale, spinoso, granuloso, corneo; a livello dei distretti anatomici cutanei più spessi maggiormente esposti agli insulti meccanici e pressori (palmo delle mani e pianta dei piedi), è particolarmente sviluppato, tra lo strato granuloso e corneo, il cosiddetto strato lucido (**Proksch, Brandner, e Jensen 2008**).

Lo strato basale è composto da un unico strato di cellule cuboidali che poggiano sulla membrana basale mediante giunzioni ancoranti chiamate emidesmosomi e danno origine ai cheratinociti degli strati successivi. Lo strato più interno del tessuto epidermico maturo è definito anche germinativo, indicando la presenza di cellule staminali epidermiche (**Fuchs e Blau 2020**). La caratteristica di queste cellule è di essere altamente indifferenziate e in continua divisione mitotica, essenziale per il controllo dell'omeostasi del tessuto stesso, mantenendo la capacità proliferativa dello strato basale e, allo stesso tempo, generando un flusso costante di cellule indotte verso un differenziamento ascendente e terminale rinnovando il tessuto epidermico circa ogni

4 settimane (**Jones, Harper, e Watt 1995**). I cheratinociti all'interno dello strato basale costituiscono una "nicchia cellulare unica" caratterizzata dal loro contatto con la membrana basale, composta da componenti della matrice extracellulare e fattori di crescita, forniti sia dall'epidermide che dal derma sottostante (**Gonzales e Fuchs 2017**). L'omeostasi della nicchia è orchestrata in parte dalle cellule stesse che la compongono e in parte da una serie di fattori localizzati nelle immediate vicinanze. È stato dimostrato che le interazioni matrice extracellulare-integrina, fattori di crescita e altri ligandi secreti nelle vicinanze della nicchia influenzano l'auto-rinnovamento delle cellule staminali epidermiche (**Goel et al. 2017**). La crescita epidermica deve essere attentamente bilanciata: una proliferazione inadeguata determina assottigliamento della cute e perdita di protezione, e una crescita eccessiva è caratteristica dei disturbi iperproliferativi. La regolazione della nicchia deve consentire la percezione delle esigenze di espansione e di sostituzione dei vuoti dello strato basale mediante la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali epidermiche, ma anche percepire quando terminare questo processo. È stato ipotizzato che le giunzioni aderenti e le strutture di adesione cellulare, in particolare l' α -catenina e la E-caderina, potrebbero avere una funzione nel "rilevare" la densità delle cellule epidermiche e nel limitare la proliferazione delle cellule basali (**Schlegelmilch et al. 2011**). Inoltre, fattori estrinseci possono influenzare il comportamento delle cellule staminali epidermiche, come le forze meccaniche esercitate sugli strati sovrastanti e lo *stretching* cutaneo che ne determina l'espansione della cute creando uno stimolo transitorio nell'attività di rinnovamento cellulare (**Aragona et al. 2020**).

Lo strato spinoso è costituito da un numero variabile di 3-5 fila di cellule che lo rendono il più spesso dell'epidermide. Le cellule possiedono una tipica morfologia prismatica con delle estroflessioni citoplasmatiche simili a spine connesse a quelle delle cellule contigue mediante desmosomi; quest'ultimi creano una stretta connessione meccanica tra le cellule in modo che riescano a contrastare le sollecitazioni meccaniche. Si tratta di cellule con un'intensa attività protido-sintetica, capaci di sintetizzare le varie proteine, come le citocheratine che caratterizzano i vari strati.

Presentano un nucleo vescicoloso eucromatico in posizione centrale e un citoplasma basofilo (Kadaja et al. 2014).

Lo strato sovrastante, quello granuloso, è costituito da 3-4 strati di cellule appiattite che vanno incontro ad un processo di differenziazione terminale (o cheratinizzazione). Il citoplasma è ricco di masserelle intensamente basofile, che corrispondono a granuli di cheratoialina, un precursore proteico della filaggrina, proteina caratteristica dello stato più differenziato del processo di citomorfosi cornea, che porterà alla formazione dello strato corneo. Queste strutture granulari si associano ad altre strutture caratteristiche, ovvero i granuli lamellari, che derivano dall'apparato di Golgi e che rappresentano piccole strutture ovoidali contenenti numerose lamelle costituite da lipidi e glicolipidi. I granuli vanno incontro ad esocitosi liberando il proprio contenuto che crea intorno alle cellule uno strato impermeabile ricco di lipidi; questo strato va a costituire la barriera epidermica che previene la perdita di acqua (Palmer et al. 2006). Lo strato corneo è formato da 15-20 strati di derivati cellulari che si presentano come scaglie cheratinizzate legate tra loro da un cemento idrofobico ricco di lipidi in superficie; esse via via vengono continuamente desquamate dal momento che i desmosomi e le membrane cellulari, ricche di lipidi, si rompono. Si ha così il rilascio di cheratina, una proteina estremamente acidofila ed eosinofila che conferisce l'aspetto rosaceo alla porzione più superficiale dell'epidermide (Khavkin e Ellis 2011).

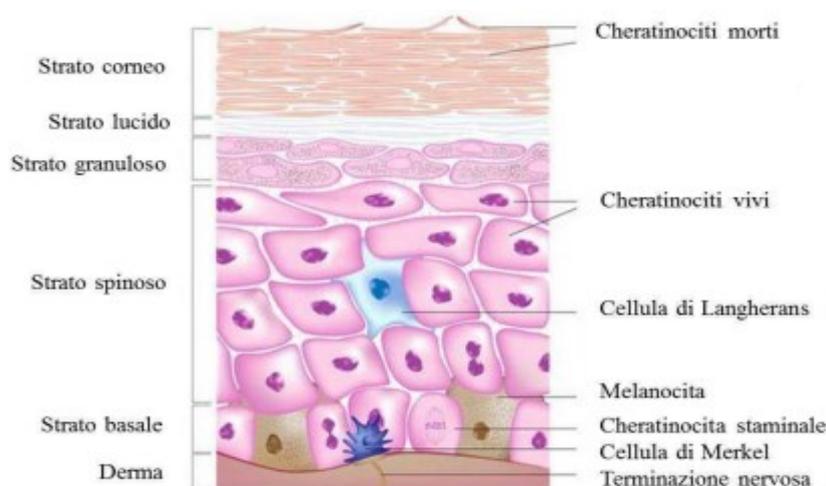


Fig.2 Disegno schematico dell'istologia dell'epidermide (Balboni G. C. et al. 2000 Anatomia umana, Milano, edi.ermes, 3vv.)

Oltre ai cheratinociti, come citato in precedenza, nell'epidermide sono presenti anche altri tipi cellulari: melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel.

I melanociti, derivati dalla cresta neurale durante lo sviluppo embrionale, sono posizionati nello strato basale dell'epidermide ed hanno la funzione di sintetizzare un pigmento bruno-scuro, la melanina. Il flusso melanogenico è regolato da enzimi melanogenici (tirosinasi, TRP1, TRP2), cationi metallici bivalenti, attivatori e inibitori ed altri fattori di regolazione; la tirosinasi è l'enzima catalizzatore della reazione di idrossilazione dell'L-tirosina a diidrossifenilalanina (DOPA) che poi viene polimerizzata e trasformata nelle varie forme di melanina, diversamente gli altri determinanti melanogenici controllano la qualità e la quantità di melanina formata. La melanina viene accumulata all'interno di granuli, i melanosomi, i quali vengono trasportati tramite la chinesina all'estremità delle terminazioni citoplasmatiche e trasferiti all'interno dei cheratinociti. Qui vengono internalizzati in modo tale da consentirne l'accumulo e formare una protezione del cheratinocita nei confronti degli effetti mutageni delle radiazioni UV (**Nordlund 2007**). Le radiazioni, infatti, inducono la liberazione di un particolare ormone chiamato MSH (ormone melanocita-stimolante) che agisce sul melanocita attivando la sintesi di melanina contenuta nei melanosomi e la cessione di questi alle cellule epidermiche. L'MSH riveste ruoli diversi a livello centrale (ipotalamico) e a livello periferico (cute), agendo sui recettori MCR (*melanocortine receptor*). A livello cutaneo, la stimolazione dell'MCR 1 stimola il melanocita a sintetizzare la melanina; la stimolazione di MC1R induce la formazione di un fattore di trascrizione chiamato MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*) che permette la lettura dei geni responsabili della sintesi degli enzimi necessari alla trasformazione della tirosina in melanine: eumelanina, polimero insolubile marrone-nero e feomelanina, polimero solubile rosso-giallo (**D'Orazio et al. 2013**).

Le cellule di Merkel sono localizzate nello strato basale dell'epidermide, interagiscono con fibre nervose sensitive e fungono da recettori per il tatto lieve. Queste cellule contribuiscono alla sensibilità cutanea associata alla presenza di altre strutture, ovvero dei veri e propri recettori sensitivi che includono le terminazioni nervose libere a livello dell'epidermide che ricevono le informazioni nocicettive e termiche. Altre strutture sensitive presenti sono gli organuli come i corpuscoli di Meissner e del Pacini, che hanno la funzione di recepire il tatto e la pressione (**Kadaja et al. 2014**).

Le cellule di Langerhans sono cellule dendritiche che derivano da precursori emopoietici presenti nel midollo osseo e sono in grado di riconoscere, captare ed elaborare molecole ad attività antigenica per poi presentarle alle cellule immunocompetenti. Sono caratterizzate dalla presenza a livello citoplasmatico di piccoli granuli neurosecretori con un core denso e che derivano dall'apparato di Golgi, al cui interno presentano dei peptidi che fungono da neurotrasmettitore; attraverso il contenuto di questi granuli riescono a trasmettere la sensibilità alle terminazioni nervose. Vengono anche definite "cellule presentanti l'antigene": derivano dai monociti e sono visibili nello strato spinoso perché presentano dei lunghi prolungamenti citoplasmatici che raggiungono le porzioni più superficiali dell'epidermide; si inseriscono tra i cheratinociti di tutti gli strati formando nell'epidermide una rete molto densa. Questa rete di cellule ha la capacità di catturare antigeni che entrano nell'epidermide e portarli nel circolo sanguigno dove vengono riconosciuti da linfociti T helper che vanno a stimolare l'azione di linfociti B che producono anticorpi per quel dato antigene. I granuli di Birbeck presenti nel citoplasma sono coinvolti nel processamento dell'antigene. Con le cellule di Granstein costituiscono il sistema linfoide associato alla pelle (**Hussein 2005**).

1.2.1 Proliferazione e differenziamento cellulare dell'epidermide umana

Nell'uomo, il processo di formazione dell'epidermide, di origine ectodermica, avviene intorno la terza-quarta settimana di sviluppo embrionale. L'espressione delle cheratine 8-18 sulla superficie ectodermica determina la fase di transizione e formazione dello strato basale dell'epidermide, costituito da cellule con intensa attività proliferativa che sono in grado sia di produrre altre cellule che si spostano negli altri strati più superficiali, differenziandosi mano mano e consentendo il *turnover* dell'epidermide.

A livello dello strato basale i cheratinociti sono presenti in 3 stati funzionali differenti:

- cellule staminali

- cellule *committed* o TA (*Transit-Amplifying cells*), ovvero progenitori cellulari destinati ad originare cellule che andranno a differenziarsi e a costituire gli strati più superficiali

- cheratinociti differenziati in modo definitivo

La divisione in questi 3 compartimenti (staminale, di transito, differenziato) consente di produrre un consistente numero di cellule tissutali a fronte di un numero di divisioni delle cellule staminali estremamente ridotto. Il patrimonio delle cellule staminali risulta il più possibile protetto dal rischio di mutazioni che possono avvenire ad ogni ciclo mitotico. Per cui a livello dello strato basale esiste un numero limitato di cellule staminali (molto rare). Dalle staminali originano le cellule TA o *committed* e infine le cellule differenziate (**Jones e Watt 1993**). La divisione delle cellule staminali dell'epidermide è peculiare anche per il tipo di orientamento che segue. Esse, infatti, possono avere una divisione asimmetrica che segue il piano della membrana basale su cui poggiano. Questo meccanismo è tipico dei primi stadi dello sviluppo embrionale; infatti, le cellule aumentano il loro numero all'aumentare dello sviluppo embrionale per far in modo che ci sia un aumento della superficie cutanea. In un secondo momento

durante la stratificazione dell'epidermide, oltre alla divisione in senso orizzontale, si ha anche un tipo di divisione in senso verticale (divisione simmetrica). Quindi da una cellula germinativa si sviluppa una cellula già destinata a differenziarsi, ovvero TA, caratterizzata da una specifica polarità dovuta a caratteristiche proteine citoplasmatiche e di membrana. Questo meccanismo (divisione simmetrica e asimmetrica) si conserva anche durante l'omeostasi dell'adulto nei processi di *turnover* dell'epidermide, dove una cellula eredita il destino differenziativo e una rimane staminale (**Lechler e Fuchs 2005**).

L'epidermide è costituita da un compartimento polarizzato di cellule in grado di differenziare e di proliferare. All'interno di ciascun compartimento epiteliale, il processo di rinnovamento è garantito da un programma di stratificazione e di differenziazione terminale. Infatti, l'epidermide è un esempio di tessuto epiteliale dinamico. I processi di proliferazione e di differenziamento sono regolati da meccanismi precisi nei quali svolgono ruoli preponderanti alcuni fattori di trascrizione, come p63 e c-myc per quanto riguarda la proliferazione e AP2 α/γ e Notch per il differenziamento (**Fuchs e Raghavan 2002**).

Nel processo di **proliferazione** è importante il controllo positivo dell'integrina $\beta 1$ e di TGF α , insieme ai fattori di trascrizione p63 e c-myc, i quali appartengono alla famiglia di protooncogeni P53 e P73. Questi sono stati proposti come *markers* delle cellule staminali epidermiche in quanto la loro isoforma sembra essere fondamentale per il mantenimento del potenziale proliferativo dello strato basale; anche l'inibizione del fattore TGF β sembra portare ad una iperproliferazione dello strato basale (**Mills et al. 1999**).

Per il controllo del **differenziamento** hanno un ruolo importante i segnali di Notch, AP2 α/γ , PPAR α e KLF4. In particolare, quando Notch è inibito nello strato basale da Numb, si attiva lo strato spinoso, ciò determina lo *switch* da uno strato all'altro. Mentre

KLF4 e PPAR α regolano geni espressi più tardivamente nel processo di differenziamento. Inoltre, il passaggio allo strato corneo blocca tutte le attività metaboliche. Questi meccanismi molecolari non sono molto conosciuti. Il mantenimento della nicchia di staminalità dello strato basale dell'epidermide e il controllo del meccanismo di differenziamento delle cellule degli strati più superficiali, dipende dall'ancoraggio dell'epidermide con il connettivo sottostante mediante la membrana basale. Due strutture specializzate mediano l'adesione dello strato basale alla matrice extracellulare sottostante, ovvero gli emidesmosomi e le giunzioni focali (Hsu, Li, e Fuchs 2014).

L'emidesmosoma si forma dalle placche di adesione, le quali sono costituite da filamenti di cheratina citoplasmatici che raggiungono questo addensamento proteico intracitoplasmatico (emidesmosoma) per poi ripiegarsi ad ansa e tornare nel citoscheletro della cellula stessa. A questo addensamento proteico interagiscono anche altre proteine extracellulari che fanno parte della placca di adesione e che interagiscono con la lamina basale, ovvero una struttura laminare che appartiene alla membrana basale formata anche da una lamina reticolare sottostante tipica del tessuto connettivo. I filamenti di ancoraggio sono creati da strutture proteiche filamentose come la laminina 5, che interagiscono nell'agganciare e nell'aderire con la porzione basale della membrana cellulare dello strato germinativo. Oltre a queste proteine vi sono anche le integrine, come l' α 6- β 4 integrina, che interviene nella connessione dell'epidermide alla membrana basale sottostante. Quindi un'alterazione genica di queste proteine determina un'anomalia morfologica della struttura epiteliale. Alterazioni a carico degli emidesmosomi sono responsabili delle modificazioni strutturali dell'epidermide in alcune patologie come *epidermolysis bullosa simplex* o il *pemphigus foliaceus*, una patologia cutanea su base autoimmune che interessa una caderina desmosomiale, la DSG1 (forma le giunzioni aderenti). Questa patologia si presenta una sintomatologia caratterizzata da vescicole e bolle, e si assiste ad un distacco dello strato basale dell'epidermide dalla membrana basale e quindi dal derma sottostante e ad una disgregazione tra le cellule. Ci sono altre due strutture che consentono l'adesione cellula-cellula nello strato basale: le giunzioni aderenti e i desmosomi. All'interno delle giunzioni aderenti, le interazioni transcellulari

della E-caderina stabiliscono una connessione cellula-cellula, mentre le interazioni E-caderina-catenina determinano una connessione con l'actina del citoscheletro. I desmosomi, che si collegano alla rete di cheratina all'interno delle cellule, sono necessari per il mantenimento e l'integrità della cute. La forza delle adesioni desmosomiali in associazione con la struttura flessibile delle cheratine permette alla cute di resistere ai traumi meccanici (**Moreci e Lechler 2020**).

1.2.2 Tight junctions

Un altro ruolo importante per il mantenimento dell'integrità e della polarità dell'epidermide è svolto dalle *tight junctions* (TJs) o giunzioni strette.

Queste sono giunzioni intercellulari epiteliali situate nella regione più apicale tra i punti di contatto cellula-cellula; vengono strutturalmente definite avvalendosi dell'utilizzo della microscopia elettronica. L'analisi microscopica su sezioni sottili di epidermide permette di osservare le TJs, che appaiono come regioni in stretta apposizione tra due membrane plasmatiche adiacenti (**Pummi et al. 2001**). Il ruolo chiave delle TJs è quello di formare una barriera semi-permeabile che limita la diffusione delle molecole attraverso lo spazio cellulare (*barrier function*), e funge da "membrana di apposizione" (*fence function*) essenziale per evitare il *mixing* e il flusso di proteine tra il dominio apicale e basolaterale della membrana; delimitano le aree specializzate della membrana cellulare deputate all'assorbimento o alla secrezione (le proteine apicali non possono migrare oltre le giunzioni), che si trovano quindi verso la parte apicale. Mantengono i gradienti ionici necessari al funzionamento dei meccanismi di trasporto attraverso la membrana (**Sawada 2013**).

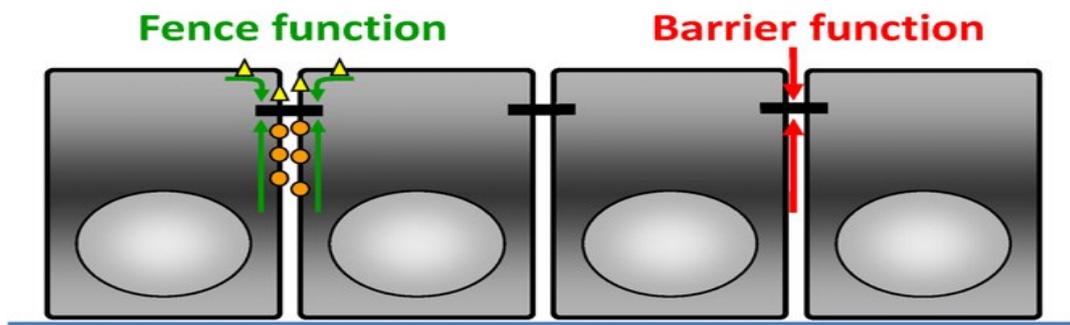


Fig. 3 Funzioni delle tight junctions: Fence function: funzione di barriera selettiva necessaria per prevenire il mixing proteico tra il dominio apicale e basolaterale della membrana cellulare. Barrier function: regola la diffusione di soluti attraverso lo spazio paracellulare (Sawada et al.; 2013)

La composizione molecolare delle TJs è stata ampiamente studiata, e ad oggi si conoscono numerose proteine integrali di membrana che compongono e consentono alle giunzioni di svolgere le funzioni prima citate. Tra queste, le claudine giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della permeabilità paracellulare, e interagiscono con le giunzioni occludenti ZO (*zonula occludens*), una famiglia di proteine che fungono da impalcatura o *scaffold*, essenziali per l'assemblaggio delle TJs mediante l'interazione con microfilamenti di actina. Inoltre, vi sono proteine di membrana come la tricellulina e l'occludina che contengono il dominio MARVEL e interagiscono con le stesse proteine esposte sulla membrana della cellula adiacente in modo omofilo, e le molecole di adesione giunzionale JAMs (*Junctional adhesion molecules*) appartenenti alla super famiglia delle immunoglobuline (Otani e Furuse 2020).

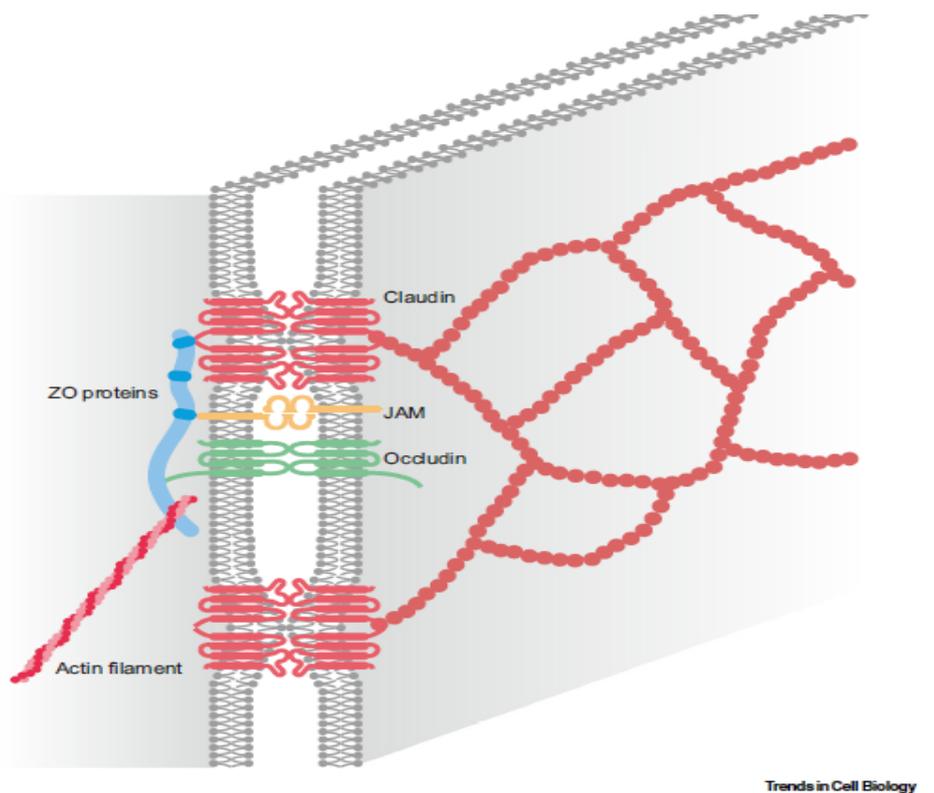


Fig. 4 Organizzazione molecolare delle TJs (Otani et. al.; 2020)

Attraverso numerosi studi è stata dimostrata l'alterazione strutturale e molecolare delle TJs durante condizioni infiammatorie cutanee; inoltre, l'influenza dell'infiammazione sulle TJs non è ristretta solamente al livello cutaneo, ma può manifestarsi anche a carico dell'epitelio intestinale, bronchiale e nasale (**Bäsler e Brandner 2017**).

L'infiammazione è un processo di difesa dell'organismo in risposta a fattori e stimoli endogeni ed esogeni dannosi. Coinvolge prevalentemente il sistema immunitario innato e in fasi successive anche componenti del sistema immunitario adattativo. Dopo l'identificazione dello stimolo dannoso, sulla superficie o all'interno della cellula, attraverso specifici recettori, vengono rilasciate citochine proinfiammatorie e chemochine per dare origine ad un infiltrato infiammatorio (**Bäsler et al. 2016**).

L'infiammazione della cute può essere provocata da stimoli estrinseci come ad esempio le radiazioni UV, l'*uptake* di microorganismi, assorbimento di allergeni o il contatto con agenti e sostanze irritanti; così come può essere indotta da stimoli

intrinseci, non sempre ben definiti, come le risposte autoimmuni. Spesso è innescata da una combinazione di entrambi i fenomeni (Clydesdale, Dandie, e Muller 2001).

1.3 Modelli biologici sperimentali

Nell'ambiente esistono sostanze di derivazione naturale, chimica o sintetica in grado di provocare fenomeni di tossicità negli organismi viventi. Per questo motivo risulta importante valutare questa tossicità in modo da stabilire i rischi derivanti da una esposizione acuta o cronica a tali composti. Per poter effettuare questa valutazione esistono principalmente due tipi di approccio: metodi non biologici e metodi biologici. I primi, detti anche "*in silico*", fanno riferimento a simulazioni o modelli matematici che permettono di simulare, in maniera statica o dinamica, processi cellulari o fisiologici anche complessi. In questo modo cercano di ricreare il più possibile la complessità di un sistema vivente, pur restando metodi in grado solo di ipotizzare l'eventuale tossicità di un composto o di una sostanza in un organismo vivente. È quindi necessario sottolineare che questi metodi possono solo integrare e non sostituire i modelli sperimentali biologici che, al contrario dei precedenti, rappresentano tutte quelle applicazioni sperimentali attuate su sistemi biologici.

Esistono tre grandi categorie di metodi biologici: modelli *in vivo*, modelli *in vitro* e modelli *ex vivo* (Bakhshandeh et al. 2017).

- **Modelli in vivo:** utilizzano l'organismo vivente nella sua totalità.
- **Modelli ex vivo:** utilizzano organi o porzioni di essi isolati dall'organismo vivente e perfusi.
- **Modelli in vitro:** si basano sull'utilizzo di una determinata parte dell'organismo vivente. In base alla porzione utilizzata si distinguono colture d'organo, colture di tessuto e colture cellulari fino ad arrivare a frazioni subcellulari come i mitocondri o i lisosomi.

I modelli *in vivo* sono utili per lo studio di fenomeni fisiologici complessi relativi ad organi o sistemi nella loro interezza. Il loro impiego nella ricerca biomedica presenta diversi vantaggi come, ad esempio, la possibilità di valutare effetti sistemici di sostanze analizzate, di monitorare contemporaneamente più parametri biologici, di studiare in tempi brevi processi biologici complessi quali cancerogenesi, teratogenesi e comportamento. I modelli *in vivo* permettono inoltre di studiare i meccanismi di tossicocinetica. I limiti delle sperimentazioni *in vivo* sono tuttavia molteplici: costi elevati, necessità di strutture e processi di stabulazione adeguati, ampia variabilità biologica delle rilevazioni sperimentali, assenza di informazioni riguardanti il meccanismo d'azione a livello molecolare della sostanza esaminata.

Gli organi perfusi (modelli *ex vivo*) rappresentano un modello sperimentale intermedio tra le colture cellulari e l'organismo intero. Essi risultano utili quando si vogliono effettuare studi che richiedono l'integrità anatomica delle diverse parti che costituiscono l'organo in studio senza passare direttamente allo studio *in vivo*. I modelli *ex vivo* sono infatti molto utilizzati in ambito farmacologico quando è necessario effettuare valutazioni di tossicità, efficacia e metabolismo a livello locale e indipendenti dall'interazione con altri organi, sistemi e apparati.

Le colture cellulari (modelli *in vitro*) costituiscono un sistema omogeneo poiché tutte le cellule contraggono identici rapporti con l'ambiente extracellulare che è il terreno di coltura; rappresentano un sistema ideale per lo studio delle funzioni cellulari e dei vari aspetti connessi con i fenomeni fisiologici e patologici conseguenti a stimoli tossici di varia natura.

Rispetto all'utilizzo di animali, i sistemi *in vitro* permettono test più economici, più veloci (con la possibilità di replicazioni del test nello stesso periodo di tempo) e più facilmente riproducibili, grazie alla standardizzazione delle metodiche. Inoltre, permettono manipolazioni genetiche e studi molecolari riguardo i meccanismi d'azione biologici.

Il limite principale consiste nella differente organizzazione tra un sistema sperimentale costituito da cellule isolate tra loro e un organismo nella sua interezza e complessità funzionale e strutturale. I sistemi *in vitro* generalmente non riescono a fornire

informazioni utili riguardo processi biologici complessi quali la tossicocinetica e il metabolismo di sostanze (es. potenziali farmaci) (Corrò, Novellademunt, e Li 2020). Nonostante sussistano delle differenze rispetto alla situazione tipica dell'organismo, le colture cellulari possiedono caratteristiche adeguate ad una loro ampia applicazione nella ricerca biomedica superando parzialmente il problema della validazione dei test per la specie umana in quanto sono numerosissime le linee cellulari umane disponibili in commercio. Importante progresso in quest'ambito è l'introduzione di sistemi di coltura tridimensionali (Ravi et al. 2015).

1.3.1 Modelli 3D

I modelli 3D presentano il vantaggio di avere una complessità maggiore rispetto alle strutture *in vivo*, permettendo quindi di avere una visione più realistica di ciò che avviene in natura. I metodi di coltura convenzionali hanno aiutato a comprendere la complessità della cellula, ma le tecniche tridimensionali sono state in grado di diminuire il divario esistente tra il sistema di coltura e la fisiologia cellulare, in quanto con le classiche colture cellulari vengono perse le componenti della matrice extracellulare, le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, fondamentali per la proliferazione e le funzioni cellulari *in vivo* (Ravi et al. 2015).

Le applicazioni dei sistemi di coltura 3D sono molteplici, tra cui studi di differenziazione e proliferazione cellulare, *drug discovery*, modelli tumorali, espressione genica e proteica, apoptosi, adesione, motilità e *signaling* cellulare, morfologia e architettura dei tessuti (Ravi et al. 2015). Il modello tridimensionale, ad oggi, rappresenta uno strumento fondamentale per la ricerca, soprattutto in ambito oncologico, con grandi potenzialità anche in ambito farmacologico, per l'ottenimento di modelli sperimentali utili ad accelerare le tempistiche necessarie allo sviluppo di nuovi sistemi terapeutici, così come la creazione di strutture *in vitro* in grado di sostituire i tessuti *in vivo* (Chaicharoenaudomrung, Kunhorm, e Noisa 2019).

1.3.2 Costrutti cutanei ingegnerizzati

Grazie alla sua semplicità di organizzazione delle cellule e dei tessuti che la costituiscono (epidermide e derma), la cute è stato il primo organo ad essere completamente ingegnerizzato. Questo è stato possibile grazie ai primi studi *in vitro* condotti negli anni '70 da Rheinwald J.G e Green H., che caratterizzarono per primi il comportamento dei cheratinociti *in vitro*, i quali creano colonie a partire da una singola cellula (**Rheinwald e Green 1975**). Queste colonie corrispondono a cloni, ovvero un insieme di cellule che derivano tutti da un'unica cellula progenitrice che presenta caratteristiche di staminalità. I cloni hanno specifiche proprietà che permettono di classificarli in:

- ❖ Olocloni → cloni generati da cheratinociti con più alta capacità proliferativa, che possono effettuare 120-160 divisioni (meno del 5% delle colonie che si formano dagli olocloni abortiscono o differenziano terminalmente)
- ❖ Paracloni → cloni in cui tutte le cellule sono prive di capacità proliferativa o generano solo colonie abortive. Derivano dalle cellule TA- *transient amplifying cells* (cellule che proliferano in maniera transiente - Non proliferano oltre le 15 generazioni)
- ❖ Merocloni → contengono cellule in uno stadio transizionale tra gli olocloni e i paracloni

Come descritto in precedenza, il potere fisiologico rigenerante della cute è attribuito alla nicchia di cellule staminali localizzate a livello dello strato basale dell'epidermide. Lo sviluppo di colture di cellule staminali epidermiche può avere una valenza nel campo degli studi clinici relativi a patologie come l'epidermiolisi bullosa o il vitiligo stabile, oppure rappresenta un'applicazione clinica nel campo della rigenerazione di ferite croniche o di ustioni, quando il danno è molto esteso e avvenuto in seguito ad ustioni o a ferite traumatiche critiche o croniche (**Gonzales e Fuchs 2017**). Inoltre, le cellule staminali epidermiche possono essere utilizzate nel campo della ricerca per studi *in vitro* per la rigenerazione dell'uretra e di altri epiteli. Questi modelli *in vitro* rappresentano importanti strumenti di ricerca e sviluppo per le industrie farmaceutiche e cosmetiche.

Importanti sono stati gli studi pioneristici e le strategie terapeutiche adottate nella soluzione di queste problematiche cliniche, che consistevano nel prelevare dei lembi di cute sana da porzioni del corpo e reimpiantarli nella zona danneggiata (**Shevchenko, James, e James 2010**). Questa procedura è attuabile nel caso di ustioni non molto estese (che ricoprono al massimo il 40% della superficie corporea). Queste tecniche hanno dei limiti soprattutto dal punto di vista delle applicazioni cliniche. Infatti, possono essere utilizzate solo se le zone ustionate sono molto estese; inoltre sono associate ad un elevato rischio di fallimento dovuto al mancato attecchimento del tessuto trapiantato oppure ad una infezione ed infine possono risultare inefficaci se il processo di autorigenerazione del tessuto è compromesso (ad esempio nel caso di una co-esistenza di altre patologie). Un altro approccio è l'utilizzo di cute crioconservata di cadavere. Il derma che viene isolato permette la vascolarizzazione necessaria per supportare il trapianto dell'innesto di cellule epiteliali autologhe (CEA). Questo avviene perché il derma è ricco di fibroblasti e riesce ad attivare il processo di granulazione che porta alla ri-epitelizzazione e alla cicatrizzazione della ferita danneggiata (**Shevchenko, James, e James 2010**). Un tempo questo metodo veniva utilizzato come un "attivatore", in quanto è costituito da una combinazione di componenti della matrice extracellulare e di cellule secernenti che contribuiscono all'interazione epiteliomesenchimale, fondamentale per la riuscita dell'innesto cutaneo. Questo tipo di procedura presenta alcuni svantaggi: scarsa disponibilità di cute da cadavere; rischio di trasmissione virale di infezioni; rischio di rigetto causato da un innesto allogenico.

Tra i primi studi pioneristici ci fu lo sviluppo di sostituti bioattivi della cute al fine di guidare il processo di autoriparazione del tessuto cutaneo rallentando la formazione di tessuto cicatriziale. I sostituti bioattivi venivano utilizzati quando la ferita non era molto estesa (**Z. Zhang e Michniak-Kohn 2012**). Sono costituiti da materiali artificiali o da matrice dermica decellularizzata. In base al tipo e alla profondità della lesione si utilizzano biomateriali diversi per sostituti bioattivi. Nel caso di lesioni profonde si utilizzano in forma di granuli, e in caso di lesioni superficiali a forma di lamine. Sono costituiti da biomateriali che rispondono a specifici requisiti di porosità e di velocità di degradazione, in modo tale che possano essere riassorbiti dalle cellule autologhe del paziente e che si attivi il processo di autorigenerazione. L'obiettivo del sostituto

bioattivo è di stimolare la migrazione delle cellule dell'epidermide che si trovano nel tessuto che circonda la ferita e condurle nel sito danneggiato, in modo che venga ricoperta la superficie del materiale biodegradabile. Il materiale deve quindi avere una certa porosità in modo tale da permettere l'interazione tra le cellule che migrano all'interno del materiale. La velocità di degradazione dei materiali non deve essere né troppo veloce (per non far perdere le caratteristiche di resistenza troppo velocemente), né troppo lenta per non ostacolare la deposizione di matrice da parte delle cellule infiltranti. Tra i biomateriali più utilizzati per la sintesi di sostituti bioattivi della cute vi sono:

- L'acido ialuronico: è un polimero lineare costituito dalla ripetizione di un'unità formata dalla N-acetilglucosammina e dall'acido glucuronico. È il principale carboidrato presente nella matrice extracellulare, è estremamente conservato ed è una macromolecola presente in quasi tutte le parti dell'organismo (soprattutto nella cute, nelle articolazioni a livello del liquido sinoviale e a livello oculare). Presenta varie proprietà, ad esempio: elevata tollerabilità; ha un ruolo nella regolazione dei processi riparativi (regola l'espressione di citochine); influenza l'attività piastrinica (ha un ruolo nella fase infiammatoria); interviene nei processi di angiogenesi in quanto i suoi prodotti di degradazione (che sono degli oligosaccaridi a catena corta) intervengono nella formazione del tessuto di granulazione coinvolto nell'angiogenesi; svolge un ruolo nel rimodellamento della cicatrice (**Price, Berry, e Navsaria 2007**).
- Silicone e nylon che forniscono flessibilità. Il silicone, essendo semipermeabile e poroso, permette la rimozione di essudato e la permeabilità ad antibiotici topici, rappresentando una barriera alla perdita di fluidi e alle infezioni (**Kim, Baez, e Atala 2000**).

Uno dei primi sostituti dermici acellulari è rappresentato dal prodotto commerciale **INTEGRA®DermalRegenerationTemplate**, una membrana biodegradabile costituita da una matrice di collagene bovino e glicosamminoglicani, ed è ricoperta da una pellicola di silicone che ha la funzione di prevenire la disidratazione e di aiutare la formazione del tessuto di granulazione. Infatti, i glicosamminoglicani hanno la funzione di fornire elasticità alla matrice e garantiscono una certa porosità alla struttura, per consentire la migrazione cellulare delle cellule del derma (fibroblasti e cellule endoteliali del

tessuto di granulazione, quindi viene depositata nuova matrice di collagene). Contemporaneamente lo strato dermico di INTEGRA® viene degradato. Una volta riattivato il derma e stimolato il processo di angiogenesi e vascolarizzazione, la membrana siliconica viene rimossa e viene applicato sul “neoderma”. uno strato di epidermide autologa o ingegnerizzata Lo svantaggio è associato al fatto che non sempre si ottengono risultati soddisfacenti quando si associa il sostituto bioattivo con l’equivalente epidermico (**Debels et al. 2015**).

Tutti questi studi pionieristici hanno consentito una progressione biotecnologica nell’ambito dell’ingegneria tissutale della cute, portando alla creazione di modelli tridimensionali di pelle umana che comprendono, tra i vari, epidermide ricostruita con uno strato corneo funzionale in grado di mimare al meglio le proprietà della pelle umana in termini di morfologia, composizione lipidica e *markers* biochimici. Questi modelli sono ormai validati per i test di irritazione, fototossicità, per valutare l’effetto corrosivo di varie sostanze chimiche e sempre più spesso proposti come alternativa ai test *in vivo* condotti su animali (**Netzlaff et al. 2005**). Alcuni di questi equivalenti cutanei sono costituiti da uno strato di gel che include fibroblasti e che riproduce le condizioni del derma *in vivo*, su cui si appoggia epidermide completamente differenziata e cheratinizzata (**Bernerd e Asselineau 1998**). Altri rappresentano modelli di epidermide pigmentata contenenti cellule di Langerhans che sono utili sia per lo studio dell’iperpigmentazione che per un’analisi della risposta immunitaria causata dai raggi UV (**Duval et al. 2003**).

Il sostituto cutaneo ingegnerizzato tecnologicamente più avanzato in commercio è **Apligraf®**, equivalente cutaneo allogenico. Un prodotto “completo” costituito sia epidermide che derma, garantendo una salda giunzione tra i due tessuti che risultano ben integrati; formato da una matrice di collagene di tipo I bovino nel quale sono dispersi fibroblasti umani di prepuzio neonatale e sulla quale è sovrapposto uno strato epidermico di cheratinociti umani (**Debels et al. 2015**). È un prodotto impiegato per il trattamento di ulcere venose delle gambe (**Falanga 1998**). Nello specifico, Apligraf® è un costrutto ottenuto da una co-coltura di fibroblasti e di cheratinociti isolati da frammenti cutanei di prepuzio neonatale separatamente espansi su *feeder layer*,

ovvero una lamina costituita da fibroblasti murini 3T3 irraggiati in modo da bloccarne la proliferazione ma non l'attività metabolica né il rilascio di fattori della matrice extracellulare. I cheratinociti così espansi vengono successivamente seminati su supporti di collagene di tipo I, realizzando l'equivalente cutaneo umano. Questo costrutto possiede una stretta analogia morfologica con la cute naturale; infatti, presenta delle cellule epiteliali basali e una spiccata differenziazione morfologica e funzionale, valutata attraverso l'espressione delle proteine caratteristiche del differenziamento cellulare, come involucrina e filaggrina negli strati superiori dell'epidermide o l'integrina $\beta 1$ a livello dello strato basale. Apligraf® presenta una buona corrispondenza con l'istioarchitettura della cute umana normale, per quanto non vi siano delle creste epidermiche e papille dermiche come nelle condizioni fisiologiche (**Shevchenko, James, e James 2010**). Le caratteristiche vantaggiose di Apligraf® sono molteplici:

- Ricreata architettura tipica della cute naturale
- Cellule epiteliali basali in attiva proliferazione e rapido *turnover*
- Spiccata differenziazione morfologica e funzionale dei cheratinociti
- Formazione di uno strato corneo superficiale
- Membrana basale alla giunzione dermo-epidermica
- Formazione di desmosomi ed emidesmosomi e ancoraggio mediato da integrine
- Sintesi di matrice extracellulare da parte dei fibroblasti dermici.

Gli svantaggi risiedono nell'uso di *feeder layer* che, di natura animale e xenogenica, aumenta il rischio di contaminazioni e di trasmissione di macromolecole infette o virali.

1.3.3 Sostituti dermici

La maggior parte delle procedure di ingegnerizzazione della cute si basano su un espianto cutaneo che prevede la separazione dell'epidermide dal derma attraverso procedure enzimatiche. Il derma viene ridotto a piccoli frammenti bioptici che vengono posti in una Petri per avviare la coltura primaria di fibroblasti, successivamente espansi e seminati su uno *scaffold* per creare dei sostituti dermici. In parallelo l'epidermide

viene sottoposta ad un procedimento di disgregazione enzimatica e meccanica in modo da isolare cellule epiteliali, tra cui i cheratinociti dello strato basale (quindi cellule TA e staminali). Una volta isolate le cellule staminali, esse vengono espanse in condizioni di coltura particolari in modo tale da ottenere degli olocloni da utilizzare per creare ulteriormente la coltura di cheratinociti da utilizzare in co-culture per realizzare la cute ingegnerizzata 3D (Martínez-Santamaría, Guerrero-Aspizua, e Del Río 2012).

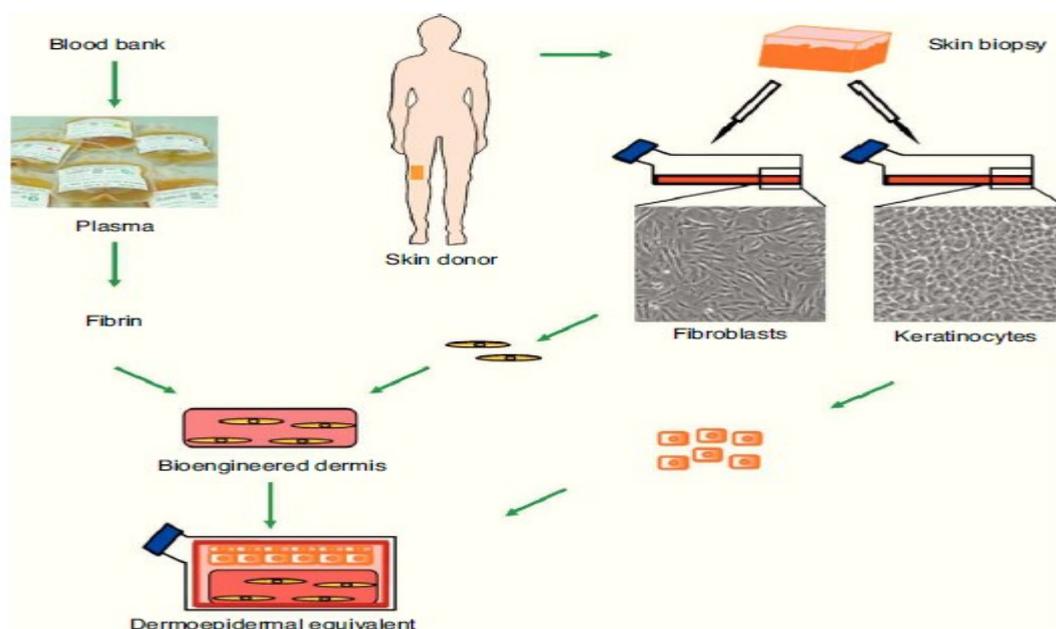


Fig. 5 fibroblasti e cheratinociti derivati da biopsia cutanea di donatore vengono espansi in terreni di coltura. I fibroblasti vengono successivamente espansi su scaffold per creare un sostituto dermico. In parallelo, le cellule staminali epidermiche vengono isolate ed espansi in coltura di cheratinociti per essere utilizzate nella realizzazione del costrutto cutaneo equivalente (Martínez- Santamaria et al.; 2012)

Esistono numerose tipologie di sostituti dermici ingegnerizzati della cute che contengono la componente cellulare. Tra questi, il **Dermagraft®**, un sostituto dermico sterile allogenico (è uno scaffold di 0,25 mm), crioconservato, derivato da coltura di fibroblasti umani dermici neonatali (non autologhi) e seminati su *scaffold* in maglia di poliglattina biorassorbibile. L'utilizzo di cellule non autologhe riduce i tempi di attesa, infatti nell'arco di 2-3 settimane la colonizzazione del tessuto è completa ed è possibile applicarlo sul paziente; i costi sono relativamente bassi (Cooper et al. 1991).

Un altro tipo di sostituto dermico ingegnerizzato prodotto da un'azienda italiana è **Hyalograft® 3D**, un sostituto dermico autologo con uno spessore di 0,3 mm. È basato su uno *scaffold* realizzato con materiale biorisorbibile ottenuto dall'esterificazione di acido ialuronico. È usato nel trattamento di lesioni profonde del derma, ulcere croniche ed ustioni di I e II grado. In genere è utilizzato in combinazione con **Laserskin®**, un equivalente epidermico. Questo prodotto è costituito da una lamina di acido ialuronico all'interno della quale vengono seminati fibroblasti autologhi precedentemente isolati dal derma del paziente. All'interno di questo materiale le cellule trovano una struttura adeguata all'adesione, proliferazione e produzione di costituenti della matrice extracellulare necessari per la rigenerazione. Inoltre, le microfibre di **Hyaff®** (membrana porosa con diametro di 0,5 μ) rilasciano frammenti di acido ialuronico a basso peso molecolare e ciò contribuisce alla maturazione del tessuto di granulazione. Al momento del trapianto questo prodotto viene applicato sulla ferita dopo aver rimosso i residui necrotici. I vantaggi sono rappresentati dall'utilizzo di cellule autologhe e dai ridotti tempi di attesa; inoltre i costi per la produzione sono contenuti (**Chaudhari et al. 2016**).

1.3.4 Sostituti epidermici

I sostituti epidermici possono essere utilizzati per testare la permeabilità della pelle a vari cosmetici, agenti per la cura personale e farmaci applicati localmente. È importante per le aziende cosmetiche e farmaceutiche disporre di un sistema di *screening in vitro* affidabile per testare la quantità di farmaci e principi attivi che permeano nell'epidermide (**Gabbanini et al. 2009**). Negli ultimi anni, aziende come L'Oreal/SkinEthic hanno investito molte risorse nello sviluppo di modelli epidermici per l'analisi di composti farmaceutici, cosmetici e chimici.

La barriera di permeabilità cutanea che risiede nello *strato corneo* è composta da una combinazione di lipidi cutanei, tra cui: ceramidi, colesterolo, esteri del colesterolo e acidi grassi liberi, che vengono impaccati nello spazio intercorneocitario per formare fogli multilamellari. Attraverso studi sperimentali, è stato determinato che la corretta composizione lipidica dello spazio intercorneocitario è uno dei fattori principali per una

miglior permeabilità cutanea della maggior parte di sostanze e cosmetici applicati per via topica. Pertanto, al fine di creare una valida barriera di permeazione, il processo di differenziazione epidermica e il successivo accumulo e organizzazione dei lipidi devono essere paragonabili a quelli della cute umana (**Z. Zhang e Michniak-Kohn 2012**).

I sostituti epidermici attualmente presenti in commercio sono molteplici, tra questi, SkinEthic™, EpiSkin® ed Epiderm®, evidenziano ragionevoli somiglianze con il tessuto umano nativo in termini di morfologia, composizione lipidica e marcatori biochimici. Questi modelli sono attualmente utilizzati per la verifica di test associati alla fototossicità, irritabilità e corrosione; inoltre, rappresentano dei modelli idonei per la veicolazione di farmaci e altri xenobiotici. Tuttavia, la funzione di barriera protettiva non sembra riprodurre fedelmente quella dell'epidermide nativa (**Netzlaff et al. 2005**).

SkinEthic™ RHE

SkinEthic™ RHE (epidermide umana ricostruita) è un equivalente epidermico progettato e sviluppato presso i laboratori SkinEthic in Francia (Nizza) fondati da Martin Rosdy. Il 28 febbraio 2006 l'azienda L'Oréal annunciò che la filiale del Gruppo EpiSkin, specializzata nell'elaborazione di cute ricostituita, acquisiva SkinEthic. I dati tecnici e le schede di sicurezza prodotti dal laboratorio francese definiscono il modello epidermico SkinEthic™ RHE come "un'epidermide umana ricostruita *in vitro* da cheratinociti umani coltivati su una membrana di 0,5 cm² inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido, in un mezzo chimicamente definito". Questo modello esiste in diversi stadi di maturità ed è attualmente convalidato come modello *in vitro* completo, sostitutivo alla sperimentazione animale, per valutare la corrosione e l'irritazione della cute a determinate sostanze chimiche. La sua struttura generale è altamente associabile all'epidermide umana. Morfologicamente, gli strati corneo, granuloso e spinoso, maggiormente rappresentati nel tessuto umano, sono riscontrati nel costrutto (**Pellevoisin et al. 2018**). La prima descrizione di questo modello in letteratura rivelava la presenza di desmosomi, granuli di cheratoialina e granuli lamellari (**Martin Rosdy e Clauss 1990**). Emidesmosomi, filamenti di ancoraggio,

componenti della lamina densa e altre strutture simili alla membrana basale furono identificati tramite la microscopia elettronica (**M. Rosdy, Pisani, e Ortonne 1993**). Alcune differenze tra il modello SkinEthic™ e il tessuto nativo sono state identificate attraverso la valutazione quantitativa di cellule vitali e della stratificazione del corneo. Inoltre, nel costrutto epidermico è stata evidenziata un'alta concentrazione, al livello basale, di goccioline lipidiche e un'alternanza di foglietti lamellari lipidici elettrondensi e elettronucenti nello strato corneo (**Ponec et al. 2002**). Attualmente, la composizione lipidica generale del modello sembra riflettere quella del tessuto nativo, sebbene presenti una percentuale di ceramidi più alta (nonostante sia privo della ceramide di tipo 7) ed una più bassa di fosfolipidi. I *markers* biochimici presenti nel costrutto sono le cheratine 1, 10, loricrine, involucrine e transglutaminasi; in analogia con la cute umana, le loricrine sono localizzate nello strato granuloso, le involucrine e le trasglutaminasi sono state riscontrate negli strati sovrabasali (**Netzlaff et al. 2005**).

La valutazione degli effetti fototossici è avvenuta applicando il protocollo descritto da Liebsch, sottoponendo il modello all'esposizione di 13 composti fototossici e non-fototossici e alle radiazioni UVA. A seguito di questi studi, è stato dimostrato come il modello SkinEthic™ sia in grado di discriminare tra composti fototossici e non fototossici (**Bernard et al. 2000**). La valutazione degli effetti di sostanze irritabili è avvenuta applicando l'acido trans-retinoico, il calcipotriolo e sodio laurilsolfato per 24 ore; con questo test è stato possibile confermare come l'espressione di citochine e della risposta infiammatoria sia analoga a quella manifestata da una cute nativa sottoposta alle medesime condizioni (**de Brugerolle de Fraissinette et al. 1999**). Inoltre, Alépee et al. hanno condotto uno studio per determinare l'affidabilità del costrutto nel discriminare tra sostanze irritanti e non irritanti. Il test consisteva nell'applicazione topica di sostanze in esame per 42 minuti seguiti da 42 ore di post-incubazione. Il metodo di test SkinEthic™ RHE è stato applicato, con una buona riproducibilità, in tre laboratori indipendenti ed è stato possibile determinare il raggiungimento di risultati affidabili con una precisione dell'85%. L'accuratezza complessiva del metodo di test SkinEthic™ RHE è stata riconosciuta dal comitato consultivo scientifico dell'ECVAM come unico metodo sostitutivo verificato, al test *in vivo* su animali (test Draize), nella valutazione dell'irritabilità delle sostanze in esame (**Alépee et al. 2010**). Infine, gli studi

di trasporto, permeazione e assorbimento condotti su SkinEthic™ con acido laurico, caffeina e mannitolo hanno mostrato un tasso di velocità inferiore rispetto alla cute umana (**Lotte et al. 2002**).

EpiDerm®

EpiDerm® è un modello di epidermide *in vitro* commercializzato nel 1993 da MatTek Corporation di Ashland, MA, USA. La scheda tecnica rilasciata dall'azienda produttrice lo descrive come "costrutto di cheratinociti epidermici di derivazione umana normali (NHEK) che sono stati coltivati per realizzare un modello multistrato e altamente differenziato di epidermide umana" (**Netzlaff et al. 2005**). La morfologia di EpiDerm® risulta simile all'epidermide umana con una differenza indotta dalla crescita dei cheratinociti su filtri in policarbonato, ovvero l'assenza di creste epidermiche, presenti fisiologicamente nella giunzione epidermica-dermica nativa. La composizione lipidica complessiva del costrutto rispecchia quella dell'epidermide nativa, anche se manifesta una concentrazione inferiore di colesterolo e acidi grassi liberi ed è privo di ceramide 7 (**Ponec et al. 2002**). A seguito di studi condotti per valutare la tollerabilità a composti tossici, è stata confermata la capacità dell'equivalente epidermico di discriminare composti fototossici. In particolare, il principio chiave di questi studi si è basato sull'applicazione di composti tossici, a 5 concentrazioni differenti, per via topica; successivamente, ad ogni diversa concentrazione di composto tossico, è stato eseguito un irraggiamento cito-tossico e uno non cito-tossico di radiazioni UVA. È stato effettuato un saggio MTT di vitalità cellulare dopo 24h dall'irraggiamento per valutare la citotossicità, ed è stata dimostrata la capacità del costrutto di identificare composti fototossici (**Cannon et al. 1994**).

Sono stati condotti anche test di irritabilità cutanea, a seguito dei quali è stata rilevata per il costrutto EpiDerm® una reazione differente rispetto alla risposta osservata nell'epidermide umana. Pertanto, è emerso che la concentrazione di tensioattivo irritabile necessaria per suscitare una reazione cutanea era inferiore per il modello, a causa di un'efficacia non ottimale di barriera protettiva (**Faller et al. 2002**). Inoltre, mediante studi condotti da Dreher utilizzando il costrutto EpiDerm®, è stato possibile evidenziare il grado di permeazione di determinate preparazioni a base di caffeina e α -

tocoferolo acetato. La velocità di permeazione massima di caffeina e α -tocoferolo acetato è stata raggiunta più rapidamente dal sostituto epidermico rispetto alla cute umana; tuttavia, la biodisponibilità dei principi attivi presenti nelle preparazioni cosmetiche era la medesima (**Dreher et al. 2002**).

EpiSkin®

Il modello di equivalente epidermico EpiSkin® è stato sviluppato per la prima volta da E. Tinois e, nell'aprile del 1997, acquistato da L Oréal. Il kit EpiSkin® è attualmente commercializzato sotto forma di piastre a 12 pozzetti. È costituito da uno strato di matrice collagene bovina di tipo 1, rappresentante il derma, a cui è sovrapposta una pellicola di collagene umano di tipo 4 sulla quale viene deposta, dopo 13 giorni in coltura, epidermide stratificata differenziata derivata da cheratinociti umani. Questo modello viene spesso impiegato per test di irritazione. Altri costrutti sono stati ottenuti variando le tempistiche di crescita dei cheratinociti umani in coltura (fino a 20 giorni), prima del loro trasferimento sul substrato di collagene: questi modelli sono per lo più utilizzati per valutare l'assorbimento di cosmetici e farmaci (**Ponec et al. 2002**). Le cellule vitali del modello EpiSkin® presentano un'organizzazione strutturale differente rispetto all'epidermide nativa; ci sono cambiamenti morfologici nei diversi strati. Le cellule basali tendono ad essere cubiche e gli strati cellulari superiori sono piatti, così come la forma delle cellule granulari contenenti granuli di cheratoialina irregolari. I due sottotipi di EpiSkin® (per irritazione e permeazione) variano nello spessore dello strato corneo; il modello di permeazione mostra uno strato di cheratina più compatto e più spesso. La composizione lipidica generale di entrambi i modelli è associabile a quella del tessuto nativo, sebbene presentino una quantità di acidi grassi liberi e colesterolo inferiore. Le cheratine 1 e 10 sono presenti nello strato spinoso e granuloso; la cheratina 6 è presente in tutti gli strati; la loricrina è assente; le involucrine e le transglutaminasi sono presenti in tutti gli strati sovrabasali (**Ponec et al. 2000**).

Le concentrazioni di tensioattivi necessarie a creare un fenomeno di irritazione a carico dell'equivalente sono state determinate e confrontate con dati riportati in letteratura

di test sull'irritazione condotti sulla cute umana *in vivo* (Roguet et al. 1994). Da questo studio è stato possibile determinare come la concentrazione di tensioattivo necessaria per innescare una reazione nel modello sia inferiore rispetto a quella richiesta *in vivo*. Una probabile spiegazione del diverso grado di irritabilità del modello EpiSkin[®] è stata associata ad una non ottimale funzione di barriera protettiva (Roguet et al. 1994). La valutazione degli effetti fototossici è avvenuta applicando localmente sostanze fototossiche esposte ad una dose non citotossica di radiazioni UVA. Dalla quantificazione della vitalità cellulare e dal rilascio di IL1- α è stata dimostrata la capacità del modello di discriminare e identificare sostanze fototossiche (Portes et al. 2002). Inoltre, in altri diversi studi è stato possibile evidenziare il medesimo grado di permeazione di cosmetici e preparazioni a base di caffeina e α -tocoferolo acetato applicati sul modello EpiSkin[®] e sulla cute umana (Dreher et al. 2002).

1.4 Radiazioni ultraviolette (UV)

Le radiazioni ultraviolette, abbondanti nell'ambiente, contribuiscono ad un'importante varietà di malattie della pelle, tra cui infiammazione, degenerazione cellulare (invecchiamento della cute), cancro. Il sole emette radiazioni elettromagnetiche di diverse frequenze e lunghezze d'onda e l'insieme delle lunghezze d'onda elettromagnetiche costituisce lo spettro elettromagnetico che viene suddiviso in regioni parzialmente sovrapposte (D'Orazio et al. 2013).

Il Joule (J) è l'unità di misura più usata per esprimere la quantità di energia della luce. La potenza dell'irradiazione è detta irradianza e viene espressa in W/cm^2 . L'energia della luce applicata alla pelle è definita dose, viene espressa in J/cm^2 ed è il prodotto dell'irradianza per il tempo.

La radiazione solare che raggiunge la terra è composta da raggi infrarossi, spettro del visibile e raggi ultravioletti. La radiazione infrarossa (IR) ha lunghezze d'onda comprese tra 780 nm e 1 mm ed è prodotta da qualsiasi corpo caldo (Hussein 2005).

La radiazione visibile (o semplicemente luce) ha lunghezza d'onda tra i 400 e i 780 nm; è emessa da corpi incandescenti ed è l'unica percepita dall'occhio umano.

La radiazione ultravioletta ha lunghezze d'onda comprese tra 100 e 400 nm ed è invisibile all'occhio umano (ma percepibile da alcuni insetti). È a sua volta suddivisa in tre regioni a seconda della lunghezza d'onda: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm). Lo strato di ozono (O₃) presente nella stratosfera assorbe i raggi ultravioletti, soprattutto quelli con lunghezza d'onda minore (la totalità dei raggi UVC e circa il 95% degli UVB).

L'energia emessa da ciascuna porzione dello spettro elettromagnetico è inversamente correlata alla sua lunghezza d'onda, quindi gli UVC > UVB > UVA: tuttavia, la profondità della penetrazione della luce UV nella cute aumenta all'aumentare della lunghezza d'onda. Infatti, i raggi UVA, pur avendo un'energia inferiore, hanno una maggiore lunghezza d'onda e pertanto penetrano più in profondità, raggiungendo il derma; diversamente, gli UVB sono quasi completamente assorbiti nell'epidermide, raggiungendo solo parzialmente la porzione più superficiale del derma (**Clydesdale, Dandie, e Muller 2001**).

L'esposizione moderata alla radiazione ultravioletta esercita effetti positivi sulla salute psicofisica degli individui. Ad esempio, il 7-deidrocolesterolo, presente nella membrana plasmatica dei cheratinociti e dei fibroblasti del derma, assorbe i fotoni dei raggi UVB trasformandosi in provitamina D e successivamente in vitamina D; quest'ultima, durante la trasformazione, viene rilasciata nella circolazione sanguigna e prende parte alla regolazione del metabolismo del calcio. Carezza di vitamina D causa rachitismo nei bambini e osteoporosi e difetti nella mineralizzazione delle ossa negli adulti (**Holick 2004**). I raggi UVA sono in grado di inibire l'azione dell'enzima N-acetiltransferasi che converte la serotonina in melatonina. In questo modo si alza la concentrazione dell'ormone e neurotrasmettitore serotonina che è coinvolto nella regolazione dell'umore, dell'appetito e del ciclo sonno-veglia (**Gambichler et al. 2002**). Inoltre, sembra che gli UVA inducano il rilascio di basse dosi di ossido nitrico (presente nei cheratinociti) che protegge le cellule della pelle dallo stress ossidativo e dall'apoptosi indotta da UVA (attraverso meccanismi che non sono ancora del tutto conosciuti) e abbassa la pressione sanguigna. Basse dosi sia di UVA che di UVB sono utilizzate per la cura di alcune patologie infiammatorie o autoimmuni della pelle come

dermatiti, psoriasi e vitiligine perché hanno effetti immunosoppressivi (**Juzeniene e Moan 2012**).

Recentemente gli studi sugli effetti dannosi dei raggi UV si sono moltiplicati perché è chiaro ormai che un'eccessiva esposizione a questo tipo di radiazioni porta alla manifestazione di fenomeni come eritemi, ustioni, fotoimmunosoppressione, fotoinvecchiamento cutaneo e fotocarcinogenesi. Negli ultimi anni l'incidenza dei tumori della pelle è notevolmente aumentata a causa dell'incremento dell'esposizione umana al sole (**Hussein MR, 2005**).

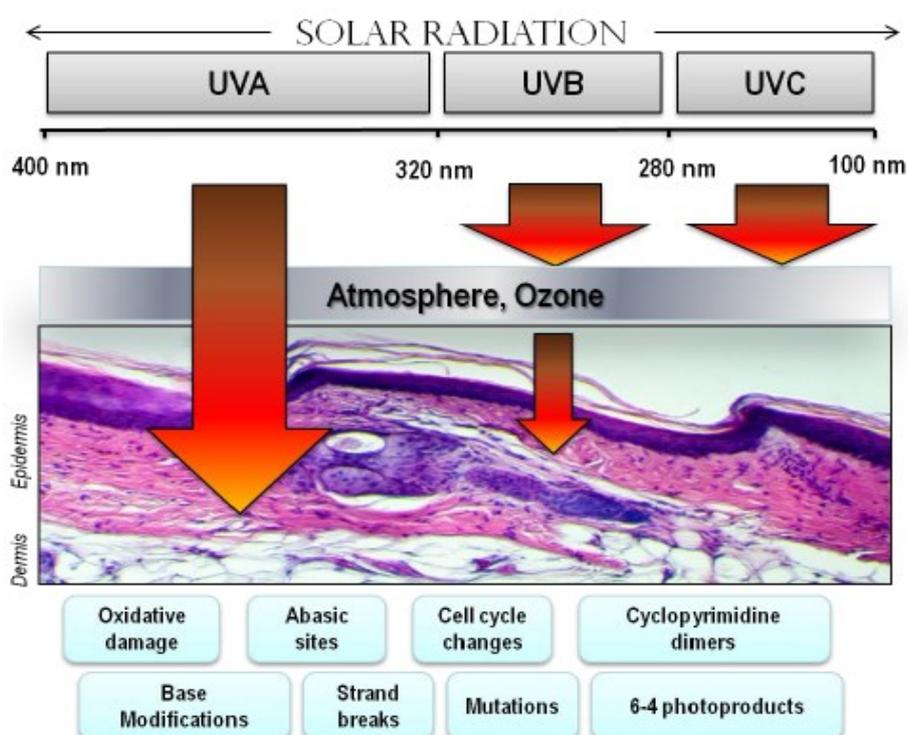


Fig. 5 Spettro elettromagnetico delle radiazioni visibili e ultraviolette (UV) ed effetti biologici indotti alla cute (**D'Orazio et al.; 2013**)

Radiazioni UVA

I raggi UVA costituiscono circa il 95% della radiazione ultravioletta totale che raggiunge la superficie terrestre; hanno lunghezza d'onda compresa tra i 320 e i 400 nm e penetrano nella cute raggiungendo il derma e quindi i melanociti (molto sensibili all'azione degli UVA) ossidando la melanina presente e contribuendo a scurire

immediatamente la pelle e provocare l'invecchiamento della stessa (**Wolber et al. 2008**).

Tutt'oggi siamo a conoscenza della capacità di questi raggi di provocare la formazione di radicali liberi dell'ossigeno ROS, cioè specie molecolari molto reattive, che sono in grado di donare o ricevere un elettrone comportandosi come ossidanti o riducenti. I radicali liberi dell'ossigeno si formano, in questo caso, dalla scissione omolitica di un legame in una molecola d'acqua, attraverso il processo di fotolisi. La loro alta reattività li porta ad avere vita media molto breve, nell'ordine dei microsecondi o meno. I ROS si formano normalmente come sottoprodotto del metabolismo dell'ossigeno ma possono aumentare molto in situazione di stress, come l'irradiazione (**Narayanapillai et al. 2012**).

In condizioni fisiologiche partecipano a molti processi come la respirazione cellulare, la trasduzione del segnale, il controllo dell'espressione genica e l'apoptosi. Possiamo citare l'anione superossido O_2^- , il perossido di idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrile OH^- sono in grado di reagire con diversi elementi cellulari come carboidrati, DNA, proteine, e lipidi (**Wang et al. 2013**).

I ROS interagendo con questi ultimi, portano alla lipoperossidazione degli acidi grassi polinsaturi di membrana causando così cambiamenti di fluidità del doppio strato fosfolipidico (**Requena et al. 1996**).

Uno dei sottoprodotti della lipoperossidazione è la malondialdeide che è in grado di formare legami crociati tra i componenti delle membrane alterandone così le funzioni (come il trasporto e la deformabilità) e reagisce con il DNA formando addotti, precursori di fenomeni di cancerogenesi (**Marnett 2000**).

La doppia elica viene danneggiata, in modo indiretto, dalle specie reattive dell'ossigeno che reagiscono con gli acidi nucleici, in particolare con le pirimidine. I principali prodotti dell'ossidazione delle basi del DNA sono la timina-glicole (derivata dall'ossidazione della timina) che si appaia erroneamente alla citosina e la 8-oxo-7,8-diidroguanina che causa una trasversione in timina e quindi un errato appaiamento 8oxoG-A (**Cadet e Douki 2011**).

Esistono glicosilasi, specifiche e non, implicate nel processo di riparazione per escissione di basi (BER) che riconoscono queste basi modificate (che non distorcono la

struttura della doppia elica) e le eliminano dal DNA lasciando un sito abasico, che viene poi processato dalla polimerasi β (D'Errico et al. 2007).

Non sempre la correzione dei danni è efficace: le rotture al singolo filamento (SSB) non riparate nella fase G1 del ciclo cellulare possono generare danni alla doppia elica (DSB) nella fase S (Wischermann et al. 2008).

Ciò può portare ad aberrazioni cromosomiche come delezioni, traslocazioni, amplificazioni o addirittura, al blocco totale dei processi di replicazione del DNA (Valko et al. 2004). Le radiazioni UVA non sembrano essere in grado di causare DSB in maniera diretta, a causa della bassa energia dei loro fotoni (Greinert et al. 2012).

L'over-produzione di ROS altera anche l'espressione delle metalloproteinasi (MMP) coinvolte nei processi di proliferazione, migrazione, apoptosi, angiogenesi e differenziamento), delle *mitogen-activated protein kinase* (MAPK, che regolano la proliferazione, l'espressione genica e l'apoptosi) e delle *cyclin-dependent kinase* (CDK, proteine regolatrici del ciclo cellulare). Modifiche a questi *pathway* possono portare ad una alterata proliferazione e differenziazione delle cellule dell'epidermide e diminuzione della sintesi di collagene (a causa della up-regolazione degli enzimi di degradazione) (Baumann 2007).

Radiazioni UVB

I raggi UVB possiedono una lunghezza d'onda tra i 280 e i 320 nm e sono per lo più assorbiti dallo strato di ozono presente nell'atmosfera e rappresentano solo il 5% delle radiazioni ultraviolette totali che arrivano sulla Terra. Gli UVB hanno un potere penetrante minore rispetto alle radiazioni ultraviolette A e causano eritemi, ustioni ed abbronzatura ritardata perché inducono l'espressione di geni coinvolti nella sintesi della melanina (Wolber et al. 2008).

Come per le radiazioni UVA, la cellula reagisce all'esposizione ai raggi UVB producendo nell'immediato specie reattive dell'ossigeno (ROS); avendo un'energia maggiore degli UVA, i raggi UVB sono più dannosi (nonostante siano in quantità minore), perché vengono direttamente assorbiti dalle basi del DNA. Si formano, in questo modo, dimeri

di pirimidine (CPD), 6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotti (6-4 PP), citidine e dimeri citidina-timina (**Maddodi, Jayanthi, e Setaluri 2012**).

Queste lesioni sono processate dal sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER). Questo *pathway* prevede il taglio a monte e a valle del danno, da parte di due nucleasi, e la risintesi di DNA. Mutazioni ad uno o più enzimi del NER porta a malattie come lo *Xeroderma pigmentosum*, che causa estrema fotosensibilità e alta insorgenza di tumori alla pelle (**D'Errico et al. 2007**).

Basse dosi di UVB vengono tollerate dalla cellula, che riesce a riparare i danni al DNA grazie al NER; alte dosi, causano lesioni così gravi da indurre la cellula ad andare in apoptosi. La proteina oncosoppressore p53 gioca un ruolo fondamentale in questa decisione: attiva la proteina p21 che, legando e bloccando il complesso CDK-ciclina, arresta il ciclo cellulare in fase G1 per permettere la riparazione oppure induce l'azione dei geni di apoptosi qualora il danno sia troppo esteso per poter essere riparato (**Khalil e Shebawy 2017**).

La radiazione acuta da raggi UVB determina un aumento delle citochine proinfiammatorie come IL-6, TNF α e IL- β , nonché IL-8 e IL-10, determinando il rilascio di prostaglandine e istamina e un aumento del numero dei macrofagi e neutrofili. In modelli sperimentali di radiazione ultravioletta è stato dimostrato che l'esposizione acuta ai raggi UVB provoca l'alterazione delle TJs. In particolare, Yamamoto et. al hanno dimostrato una più ampia localizzazione e diffusione delle zonule occludenti (ZO-1) nell'epidermide di topo esposto ai raggi UVB (**Yamamoto et al. 2008**). Tuttavia, non vi erano chiare modifiche a carico dell'occludina e della claudina-1, se non un aumento quantitativo delle stesse. Diversamente, Kawada et. Al hanno dimostrato, attraverso l'immunomarcatura, una decrescita della quantità della claudina-1 nei topi irraggiati con UVB (**Kawada et al. 2013**).

Tutti i vari esperimenti condotti nel tempo hanno permesso di definire come la radiazione UVB influenzi chiaramente la struttura delle TJs. Tuttavia, è molto indaginoso effettuare analisi comparative rigorose, considerata la variabilità di alcuni

parametri, quali la diversa dose di radiazione, i diversi tempi, le diverse specie utilizzate come modello sperimentale (Yuki et al. 2011).

Radiazioni UVC

Gli UVC hanno lunghezza d'onda compresa tra i 100 e i 280 nm e rappresentano una parte dello spettro elettromagnetico potenzialmente molto dannosa per la pelle. Hanno una lunghezza d'onda bassa, ma posseggono energia molto alta e sono in grado di penetrare la cute ad una profondità di 60-80 μm . Sono altamente tossici e mutageni per le cellule perché vengono assorbiti direttamente da diverse componenti cellulari quali proteine, membrane cellulari e DNA (infatti il picco di assorbimento massimo del DNA è tra 260 e 280 nm). Inoltre, come gli UVA e gli UVB, anche gli UVC producono specie reattive dell'ossigeno. L'enorme danno causato da questi raggi spesso porta alla morte cellulare per necrosi (Kostyuk et al. 2008). I raggi UVC vengono completamente schermati dallo strato di ozono presente nell'atmosfera, e non raggiungono la superficie terrestre; per questo motivo, il loro coinvolgimento nella cancerogenesi cutanea indotta da esposizione alla luce solare non risulta rilevante (Hussein MR, 2005).

1.5 Terapia per cattura neutronica nel boro (BNCT)

La terapia per Cattura Neutronica nel Boro (BNCT) è una particolare radioterapia volta a danneggiare in modo mirato e selettivo le cellule tumorali diffuse all'interno del parenchima del tessuto normale, risparmiando i tessuti sani adiacenti al tumore. Le componenti essenziali per l'applicazione terapeutica sono:

- sorgente di neutroni, quale un reattore nucleare o un acceleratore di particelle
- un isotopo non radioattivo del boro, il ^{10}B

Il principio si basa sulla veicolazione e penetrazione selettiva di un composto borato ^{10}B all'interno delle cellule tumorali, a cui segue l'irradiazione con neutroni a bassa energia, termici per tumori superficiali o epitermici per tumori situati in profondità. L'elevata propensione dell'isotopo 10 del boro (^{10}B) a catturare neutroni termici innesca una reazione di fissione che produce due particelle cariche ad elevata energia di trasferimento lineare (LET): una particella α (^4He) e uno ione litio (^7Li). Queste particelle perdono tutta la loro energia in un diametro di pochi micrometri (5-9 μm), determinando ingenti danni solo alle cellule contenenti boro (**Suzuki 2020**).

L'efficacia della terapia è strettamente correlata alla quantità di ^{10}B incorporato all'interno della cellula tumorale; quindi, è necessario che venga accumulata una quantità sufficiente di ^{10}B intracellulare tale che, in seguito all'irraggiamento neutronico, sia in grado di fornire alla cellula una dose letale per la cellula (**Barth et al. 2005**).

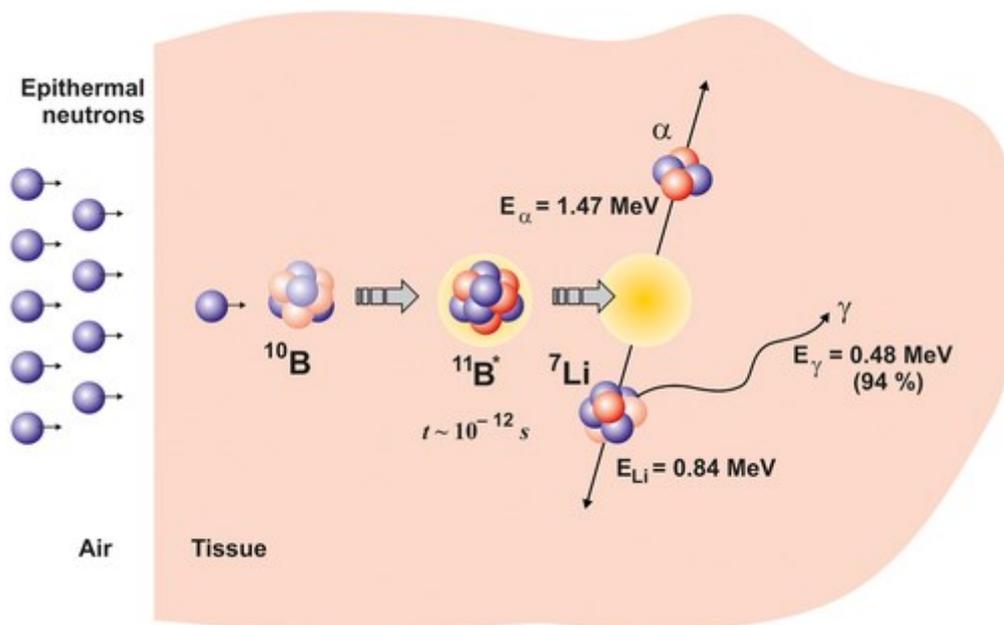


Fig. 6 Principio della BNCT (Dymova et al.; 2020)

La BNCT è una radioterapia con ampie potenzialità in ambito oncologico, tuttavia, ad oggi, sono ancora in corso studi di ottimizzazione delle varie fasi sperimentali che presentano alcuni limiti; tra cui, l'ingente costo delle attrezzature adoperate per l'irraggiamento e la scarsa disponibilità di agenti in grado di veicolare il ^{10}B in maniera selettiva all'interno delle cellule (**Dymova et al. 2020**). I requisiti principali che l'agente veicolante il ^{10}B deve soddisfare sono:

- Bassa tossicità sistemica
- Basso assorbimento del boro nel tessuto normale e alto assorbimento nel tessuto tumorale (rapporto del contenuto di boro nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale e nel tessuto tumorale rispetto al sangue > 3:1)
- Concentrazione di boro circa $20 \mu\text{g } ^{10}\text{B} / \text{g}$ di tessuto tumorale
- Rapida *clearance*
- Elevata persistenza all'interno del tessuto tumorale durante la BNCT.

1.5.1 Vettori veicolanti il boro

La ricerca per lo sviluppo di vettori veicolanti il boro selettivamente nelle cellule tumorali ha avuto inizio negli anni '50 presso il laboratorio di Albert Soloway e dei suoi collaboratori (Massachusetts General Hospital di Boston). I primi agenti utilizzati, basati sull'acido borico ed i suoi derivati, erano composti chimici elementari, poco selettivi, presentavano una scarsa ritenzione all'interno delle cellule tumorali e determinavano elevata tossicità; questi vettori vennero definiti di prima generazione. Negli anni '60, la continua analisi su centinaia di sostanze a basso peso molecolare contenenti anioni borati, ha permesso di identificare 2 composti: il sodio dodecaborato (BSH) e la borofenilalanina (BPA). Questi composti di seconda generazione sono caratterizzati da una bassa tossicità, persistono a lungo all'interno delle cellule tumorali e presentano un rapporto tumore/tessuto sano e tumore/sangue > 1. Il BSH è stato utilizzato per la prima volta per la cura di tumori cerebrali (**Barth, Mi,**

e **Yang 2018**). Si ritiene che il BSH non sia in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) sana, ma che possa raggiungere il tumore cerebrale, sfruttando il fatto che la vascolarizzazione generata dalla neoplasia non forma le giunzioni strette tipiche della BEE. Diversamente, la BPA è in grado di attraversare la BEE ed essendo un amminoacido modificato, penetra all'interno delle cellule tumorali per assorbimento selettivo mediato dal sistema di trasportatori degli L-amminoacidi (LAT1). Questo sistema di trasportatori è altamente sovraespresso in diversi tumori, contribuendo al notevole apporto di amminoacidi. Numerosi studi hanno dimostrato che la BPA viene accumulata dai melanomi, ed pertanto utilizzata a scopo terapeutico per pazienti con questo tipo di tumore cutaneo (**Dymova et al. 2020**).

Tuttavia, la struttura chimica della BPA può determinare inconvenienti durante la fase di veicolazione; infatti, essendo un derivato dell'amminoacido naturale fenilalanina, tramite la sintesi proteica può essere accumulato anche dalle cellule sane. Inoltre, i due gruppi ossidrilici liberi possono facilmente formare un legame covalente reversibile con carboidrati endogeni (glucosio, fruttosio) mediante una reazione di esterificazione. Altra criticità della BPA è dovuta alla sua scarsa solubilità. Nel tentativo di superare queste problematiche sono stati condotti numerosi studi volti ad ottimizzare la formulazione ed il trasporto. In particolare, è stata analizzata la formazione di complessi di esteri boronici tra la BPA e il cis-diolo presenti in monosaccaridi come fruttosio, mannosio, galattosio. Questa formulazione aumenta significativamente la solubilità in acqua e ha permesso l'utilizzo della BPA per il trattamento di vari istotipi tumorali. Comunque, ad oggi, BPA è il vettore d'elezione per il trattamento BNCT, ed è l'unico approvato per l'impiego in clinica. Tuttavia, sia con l'utilizzo del BSH che della BPA, è stata evidenziata una significativa variabilità nell'assorbimento da parte del tumore, specialmente nei tumori cerebrali. Questa variabilità molto probabilmente è dovuta alla marcata e complessa eterogeneità istologica, genomica ed epigenomica intratumorale (**Lamba, Goswami, e Bandyopadhyay 2021**).

Studi recenti sono volti allo sviluppo ed alla progettazione di agenti di terza generazione basati su biomolecole a basso peso molecolare, amminoacidi borati e *cluster* poliedrici di borano. Si ritiene che questi nuovi agenti possano veicolare il boro

con maggior selettività e minor tossicità rispetto agli agenti delle generazioni precedenti; tuttavia, sono ancora in fase di studio e al momento non risultano approvati per le sperimentazioni cliniche (**Suzuki 2020**).

1.5.2 Morte cellulare indotta da BNCT

L'efficacia della BNCT è determinata da vari fattori come la modalità e la via di somministrazione del farmaco, la distribuzione del boro all'interno dei tessuti sani, del tessuto tumorale e ancora più specificatamente all'interno delle cellule tumorali. Per la somministrazione di un composto borato si applica, solitamente, un'infusione venosa, seguita dall'irradiazione di neutroni termici. Il meccanismo di morte cellulare indotta da BNCT è basato sull'emissione di radiazioni ionizzanti. Tutte le radiazioni ionizzanti determinano un effetto biologico pronunciato, favorendo la rottura dei legami tra gli atomi. La morte della cellula bersaglio può avvenire per effetti diretti e indiretti. Un effetto indiretto è rappresentato dalla radiolisi dell'acqua che comporta la produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno, che alterano funzione e la stabilità di macromolecole come polisaccaridi, proteine, lipidi. L'effetto diretto e primario, che con maggior probabilità provoca morte cellulare, è il danno al DNA. La rottura al singolo filamento di DNA (SSB) e al doppio filamento (DSB), danni alle basi azotate, interruzione dello scheletro zucchero fosfato e dei legami crociati tra DNA-DNA e DNA-proteine. Le cellule sono provviste di meccanismi specifici in risposta a tali danni. In particolare, in risposta a danni diretti al DNA, si ha l'attivazione dell'oncosoppressore p53 che determina l'arresto del ciclo cellulare e la successiva attivazione del meccanismo di riparazione o l'apoptosi nel caso in cui non vi è la possibilità di riparazione del danno (**Dymova et al. 2020**). L'effetto della BNCT è proprio quello di indurre danni tali da provocare morte delle cellule neoplastiche, inducendo e accelerando il processo di apoptosi e di autofagia. L'efficacia aumenta se gli atomi di boro sono contenuti all'interno del nucleo (**Postuma et al. 2021**).

1.5.3 Aspetti storici della BNCT

L'esistenza del neutrone fu postulata nel 1932 da Chadwick, componente essenziale per la nascita della BNCT. Quest'ultima pone le proprie radici a partire dal 1936, quando Locher formulò il principio della reazione di cattura selettiva del boro all'interno delle cellule tumorali. Le prime esperienze cliniche di BNCT si sono svolte tra il 1951 e il 1959 al BNL (USA) e dal 1956 al MIT (USA). Il primo paziente trattato nel 1951 era affetto da glioma maligno. Questa prima fase si è conclusa nei primi anni 60 perché la sopravvivenza media ottenuta era confrontabile con quella delle terapie convenzionali. Inoltre, come descritto in Archambeau sono stati osservati gravi effetti collaterali dovuti a due fattori: l'utilizzo di veicolanti del boro non ottimizzati per la selettività e l'irraggiamento con neutroni di bassa energia (termici) che non penetravano sufficientemente per avere l'effetto desiderato nel tumore (**Archambeau, 1970**). Nel 1968, Hatanaka ottimizzò il protocollo sperimentale della BNCT, introducendo un nuovo composto borato, il sodio dodecaborato, che venne testato in studi clinici condotti su pazienti affetti da tumori cerebrali. Il trattamento fu eseguito mediante irraggiamento intracranico (**Hatanaka e Nakagawa 1994**). Nel 1987, in Giappone, Mishima introdusse un nuovo vettore borato, la borofenilalanina per il trattamento del melanoma cutaneo che permise l'applicazione della BNCT anche a tumori diversi da quelli cerebrali. Gli ottimi risultati ottenuti da questi studi furono determinanti per accrescere l'interesse nella ricerca e sperimentazione di questa nuova radioterapia. Attualmente, sono numerosi gli studi clinici condotti in diversi Paesi e numerosi studi di ricerca volti ad ottimizzare le problematiche associate all'applicazione clinica della BNCT (**Nedunchezian 2016**).

2 STATO DELL' ARTE

SkinEthic™ RHE rappresenta un modello tridimensionale di epidermide umana ricostruita utilizzando cheratinociti umani, progettato e realizzato presso i laboratori francesi SkinEthic (Nizza) nel 1992. Gli inserti del modello di tessuto SkinEthic™ RHE sono mantenuti a temperatura ambiente in una piastra multipozzetto con una soluzione nutriente di agarosio, poi sostituita con SkinEthic Maintenance Medium (SMM), o SkinEthic Growth Medium (SGM). Attualmente SkinEthic™ RHE è validato come modello *in vitro* completo, sostituto del modello animale in vivo, per valutare la corrosione e l'irritazione della cute dopo esposizione a determinate sostanze chimiche **(Netzlaff et al. 2005)**.

Il lavoro di Rosdy et al riporta uno dei primi studi condotti su questo equivalente epidermico come modello sperimentale relativo all'effetto modulatore esercitato dai retinoidi sulla proliferazione cellulare dello strato basale e sull'espressione di proteine coinvolte nel graduale processo di differenziamento epidermico **(Rosdy et al. 1997)**. È stato osservato, mediante l'applicazione di una crema farmaceutica composta dallo 0.05% di retinoidi, un aumento dell'espressione di ki-67 nello strato sovrabasale, la comparsa delle cheratine K19-K13 (tipiche dell'epidermide iperproliferativa) e l'inibizione della sintesi della profilaggrina nello strato granuloso. Inoltre, su sezioni di tessuto SkinEthic™ RHE colorate con ematosilina-eosina, è stata osservata l'assenza di filaggrina e di granuli di cheratoialina, dopo 24 ore dall'applicazione della formulazione farmaceutica. Infine, è stata rilevata una condizione di iperplasia dello strato basale, la quale ha determinato un aumento dello spessore totale del costrutto **(Rosdy et al. 1997)**.

2.1 SkinEthic™ RHE come primo modello cutaneo radiobiologico

Recentemente, questo modello biologico innovativo è stato impiegato per valutare gli effetti della Terapia di cattura neutronica nel boro (BNCT) (**Bortolussi et al. 2018**).

Il principio di questa radioterapia innovativa si basa sulla veicolazione e penetrazione selettiva del composto borato ^{10}B all'interno delle cellule tumorali, a cui segue l'irraggiamento del tumore solido con neutroni termici. In particolare, quando viene utilizzata la BPA come agente veicolante il boro, è stato osservato un assorbimento e una concentrazione di ^{10}B , a livello cutaneo, maggiore di circa 1.5 volte rispetto al flusso ematico (**Suzuki 2020**). Come descritto in precedenza, la cute umana è il principale organo a rischio cancerogeno durante l'esposizione alle radiazioni. Tra gli effetti indotti dall'esposizione alle radiazioni, si riscontrano l'eritema cutaneo, epilazione permanente, secchezza e desquamazione, necrosi dermica e teleangectasie. Pertanto, è estremamente importante comprendere la reazione cutanea all'esposizione di radiazione e predire eventuali danni indotti dall'applicazione della BNCT (**Proksch, Brandner, e Jensen 2008**). A tale scopo, SkinEthic™ RHE è stato impiegato per la prima volta come modello cutaneo per studi di radiobiologia, al fine di valutare gli effetti indotti dalla BNCT e ottenere una curva dose-effetto in funzione della dose assorbita di boro dopo irradiazione con raggi gamma (radiazione di riferimento), esclusivamente con neutroni e con neutroni in presenza di boro (**Bortolussi et al. 2018**). In questo studio sono riportate le prime valutazioni di vitalità cellulare, effettuate con il metodo MTT, ed i risultati delle analisi morfologiche e istologiche. Sono stati osservati gli effetti a differenti tempi dall'irradiazione: al tempo 0 (T0), dopo due giorni (T2), 5 giorni (T5) e sette giorni (T7), in modo da analizzare un'eventuale progressione dei danni alla cute in funzione del tempo trascorso dall'irraggiamento (**Gadan et al. 2012**). Dopo sette giorni dall'irradiazione, le osservazioni e le analisi dei costrutti sono state interrotte a causa della compromissione dell'integrità dei campioni, nei quali non è stato più possibile osservare e distinguere istologicamente la componente cellulare da quella cheratinizzata. Il processo di irradiazione è stato condotto nella colonna termica del reattore TRIGA MARK II dell'Università di Pavia, a diverse potenze e tempi di irraggiamento, erogando al campione dosi differenti e crescenti. Per l'irradiazione in

presenza di boro, la dose di radiazione assorbita dipende significativamente dalla concentrazione di boro presente nei tessuti. Per tale motivo in ogni esperimento è stata valutata la concentrazione di ^{10}B presente nei tessuti mediante il metodo di autoradiografia neutronica (**Bortolussi et al. 2018**). La stessa tecnica è stata applicata per valutare la concentrazione del boro nei campioni non irraggiati. La miglior uniformità e un'adeguata concentrazione di boro nei tessuti è stata osservata nei campioni esposti per 4 ore in terreno arricchito con BPA. È stato inoltre effettuato un irraggiamento dei campioni, presso il Policlinico San Matteo, con una sorgente di fotoni di riferimento, utilizzando un radiatore a raggi-x di emocomponenti dotato di due fasci di fotoni di energia media compresa tra 60 e 80 KeV (**Postuma et al. 2016**). Dal punto di vista morfologico, è stata osservata una degradazione crescente dei campioni SkinEthic™ RHE in funzione di dosi crescenti. In particolare, all'aumentare della dose assorbita, sia in presenza di BPA sia in presenza che in assenza di BPA, è stata osservata una progressiva diminuzione dello strato cellulare dei costrutti, uno sfaldamento dello strato corneo e una compromissione dello spessore totale dei tessuti SkinEthic™ RHE.

2.2 Studi inerenti alla BNCT sviluppati in Italia

In Italia gli studi sulla BNCT iniziarono intorno agli anni '80 presso l'Università degli Studi di Pavia, con lo sviluppo del progetto TAOOrMINA (Trattamento Avanzato d'Organi Mediante Irraggiamento Neutronico e Autotrapianto). Nel 2001 a Pavia, per la prima volta nel mondo, la BNCT viene applicata su un paziente in fase terminale, affetto da adenocarcinoma del colon con metastasi epatiche (**Ballarini et al. 2010**). La procedura prevedeva più fasi: perfusione epatica di due ore con soluzione di BPA, biopsie del tessuto epatico sia metastatico che normale, per verificare il rapporto delle loro concentrazioni di ^{10}B fosse idoneo per il successivo irraggiamento neutronico (> 4:1); epatectomia con contemporaneo avvio di circolazione extracorporea; il trasferimento del fegato isolato, lavato e raffreddato presso il reattore nucleare Triga Mark II dell'Università degli Studi di Pavia; l'irraggiamento neutronico di circa 10 minuti; reimpianto dell'organo ed interruzione della circolazione extracorporea. Il paziente è poi deceduto per altre complicazioni, tuttavia questi primo tentativo di BNCT

extracorporea ne ha dimostrato la fattibilità, assicurando la completa distruzione delle metastasi epatiche preservando la porzione di tessuto sano (**Zonta et al. 2006**).

Più recentemente il gruppo di ricerca sulla BNCT di Pavia ha studiato la possibile applicazione della terapia per cattura neutronica nel boro al trattamento dell'osteosarcoma. In particolare, l'assorbimento intracellulare della BPA è stato testato *in vitro* su una linea cellulare di osteosarcoma di ratto, capace di sviluppare il tumore una volta iniettato nell'animale. *In vitro* è stato rilevato un buon livello di accumulo intracellulare di boro. Successivamente, la concentrazione e la sua biodistribuzione sono state testate anche *in vivo* su ratti portatori di osteosarcoma. L'analisi ha dimostrato una maggiore concentrazione di boro intracellulare nel tumore rispetto ai tessuti sani circostanti, fornendo le premesse necessarie per il trattamento con BNCT dell'osteosarcoma. (**Ferrari et al. 2009**).

Attualmente, mediante la tecnica del 3D *bioprinting*, sono in corso studi di realizzazione e ottimizzazione di costrutti 3D di osteosarcoma e glioblastoma come modelli alternativi a quello animale per studi inerenti la BNCT. (**Delgrosso et al. 2021**).

3 SCOPO DEL LAVORO

La Terapia per Cattura Neutronica nel Boro (BNCT) è un tipo di radioterapia binaria basata sull'irraggiamento con neutroni epitermici di cellule neoplastiche precedentemente arricchite con un isotopo stabile del boro non radioattivo ^{10}B . La reazione di cattura neutronica nel boro permette il rilascio di due particelle ionizzate (α , ^7Li) che disperdono la loro energia entro un raggio paragonabile al diametro della cellula tumorale, causando un danno irreversibile al DNA e permettendo di distruggere selettivamente il tessuto tumorale lasciando intatte le cellule sane circostanti. La BNCT è una radioterapia con ampie potenzialità nell'ambito oncologico. Tuttavia, ad oggi, sono in corso studi di ottimizzazione delle varie fasi sperimentali e risulta ancora necessario il superamento di alcuni limiti, come l'insorgenza di possibili danni a livello cutaneo, provocati dalle radiazioni.

Per queste ragioni, risulta interessante approfondire le conoscenze relative agli effetti indotti dall'applicazione della BNCT a livello cutaneo. Per evitare la sperimentazione diretta *in vivo* su animali e sull'uomo di questa radioterapia innovativa, è possibile utilizzare modelli tridimensionali di equivalenti cutanei ingegnerizzati. Attualmente, sono disponibili in commercio una varietà di questi costrutti, tra cui, SkinEthicTM RHE (epidermide umana ricostruita), un equivalente epidermico progettato e sviluppato presso i laboratori EpiSkin in Francia (Nizza). Come descritto in precedenza, questo è un modello *in vitro* tridimensionale di epidermide ricostruita da cheratinociti umani, attualmente utilizzato soprattutto per la verifica di test dermatologici associati alla fototossicità e irritabilità. Inoltre, rappresenta uno dei modelli idonei per la veicolazione di farmaci e altri xenobiotici.

Proprio per l'elevata somiglianza morfologica e isto-architetturale con l'epidermide umana, SkinEthicTM RHE è stato selezionato come modello più idoneo per condurre analisi relative agli effetti determinati dalla Terapia di Cattura Neutronica nel Boro.

Durante la mia esperienza di internato di tesi presso l'Unità di Istologia ed Embriologia Generale del Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense

dell'Università degli Studi di Pavia, ho avuto l'opportunità di collaborare ad un progetto di ricerca multidisciplinare che si prefigge di ottimizzare l'applicazione clinica, in ambito oncologico, della BCNT per il trattamento di tumori disseminati o infiltrativi.

Un primo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare morfologicamente, mediante l'osservazione al microscopio ottico, i numerosi campioni del costrutto epidermico SkinEthic™ RHE. Pertanto, è stata effettuata la colorazione istologica bicromica Ematossilina-Eosina su ciascun campione oggetto di analisi. I campioni sono stati sottoposti ad irraggiamento neutronico in assenza ed in presenza di BPA, confrontati con campioni di controllo non irraggiati. Abbiamo pertanto valutato tre tipologie di campioni: il controllo (**CTR**), l'irraggiato esclusivamente con i neutroni (**senza BPA**), l'irraggiato con boro (**con BPA**). Ciascun campione è stato valutato a prestabiliti tempi di osservazione, immediatamente dopo l'irraggiamento (T0), dopo due giorni (T2), dopo 5 giorni (T5) e dopo sette giorni (T7). L'analisi morfologica è stata eseguita per valutare le eventuali alterazioni istologiche e l'integrità dei costrutti trattati in confronto a campioni controllo.

Mantenendo l'obiettivo di valutare eventuali alterazioni isto-architetture dei campioni SkinEthic™ RHE sottoposti a trattamento, un secondo approccio sperimentale ha considerato uno studio comparativo tra campioni irraggiati e il gruppo dei campioni controllo, applicando l'immunoistochimica per l'analisi delle espressioni e localizzazioni di proteine tipiche della fase di differenziamento terminale epiteliale. In particolare, sono state considerate filaggrina, involucrina e pancitocheratine, espresse fisiologicamente nell'epidermide nella fase che precede il processo di cheratinizzazione.

In parallelo, la mia collega Stefania Ricci, per ottenere una più affidabile valutazione degli effetti determinati dalla BNCT su campioni SkinEthic™ RHE, ha analizzato l'espressione di *markers* di proliferazione e riparazione cellulare, sempre con metodo immunostochimico.

4 MATERIALI E METODI

In questo progetto di tesi è stato utilizzato SkinEthic™ RHE come modello cutaneo per radiobiologia, per valutare gli effetti indotti da BNCT. I campioni sono stati sottoposti ad irraggiamento neutronico in assenza e in presenza di BPA, confrontati con campioni di controllo non irraggiato. Sono state ottenute tre tipologie di campioni: il controllo **(CTR)**, l'irraggiato esclusivamente con i neutroni **(senza BPA)**, trattato con boro e irraggiato con i neutroni **(con BPA)**. Ciascun campione è stato valutato a prestabiliti tempi di osservazione, immediatamente dopo l'irraggiamento (T0), dopo due giorni (T2), dopo 5 giorni (T5) e dopo sette giorni (T7). Sono state condotte analisi e studi istologici applicando l'immunoistochimica per l'analisi delle espressioni e localizzazioni di proteine tipiche della fase di differenziazione terminale epiteliale, in particolare filaggrina, involucrina e pan-citocheratine. È stata effettuata una colorazione bicromica Ematossilina-Eosina su ciascun campione per condurre analisi morfologiche mediante l'osservazione al microscopio ottico. Per ciascun campione è stata effettuata una misurazione dello spessore totale del costrutto epidermico e delle sue due componenti: strato cellulare e strato corneo. Le misurazioni sono state effettuate, dopo l'acquisizione delle immagini, utilizzando il programma digitale per analisi di immagine *ImageJ*⁵.

Di seguito, verranno descritte in dettaglio tutte le metodiche applicate.

4.1 Costrutto SkinEthic™ RHE

SkinEthic™ RHE (epidermide umana ricostruita) è un equivalente epidermico progettato e sviluppato presso i laboratori EpiSkin in Francia (Nizza). Gli inserti del modello di tessuto SkinEthic™ RHE sono mantenuti a temperatura ambiente in una piastra multipozzetto con una soluzione nutriente di agarosio, poi sostituita con 1 ml di *SkinEthic Maintenance Medium (SMM)*, o *SkinEthic Growth Medium (SGM)*. Il laboratorio EpiSkin fornisce per ogni lotto una scheda relativa ai controlli di qualità e sicurezza biologica, includendo anche i dati istologici.

4.2 Incubazione e assorbimento della borofenilalanina (BPA)

È stato necessario mettere a punto il protocollo di un trattamento dei costrutti con BPA, in termini di tempo di contatto e modalità di somministrazione. I campioni sono stati mantenuti per 4 e 24 ore in terreno di coltura arricchito con BPA-fruttosio e alla concentrazione di 80ppm. Il primo tempo di esposizione di 4 ore è stato scelto perché è il tempo solitamente impiegato per il trattamento delle colture cellulari; 24 ore corrisponde al tempo di contatto con BPA più lungo possibile per avere a disposizione un costrutto RHE valido per analisi fino a 7 giorni successivi. Dopo 24 ore, è stato riscontrato nei campioni trattati un assorbimento medio di boro di 30 ± 5 ppm; dopo 4 di 35 ± 5 ppm. La sperimentazione è stata quindi effettuata trattando i campioni con BPA per 4 ore per limitare il tempo di contatto e massimizzare il tempo di *follow-up*. Al termine del periodo di contatto, i campioni sono stati lavati 20 volte con il PBS per rimuovere l'eccesso di boro.

4.3 Irraggiamento e dose di radiazioni assorbite

L'irraggiamento neutronico è stato effettuato all'interno della colonna termica del reattore TRIGA MARK II dell'Università di Pavia, a diverse potenze e tempi diversi di irraggiamento, al fine di esporre il tessuto a differenti dosi crescenti.

Per l'irraggiamento in presenza di boro, la dose di radiazione assorbita dipende significativamente dalla concentrazione di boro presente nei campioni. Per tale motivo la valutazione della concentrazione di ^{10}B presente nei costrutti RHE è stata effettuata in ogni esperimento prima dell'irraggiamento, rilevata attraverso l'autoradiografia neutronica; la stessa tecnica è stata applicata per monitorare la distribuzione del boro. L'autoradiografia è una tecnica che si basa sull'uso di rivelatori plastici passivi, sui quali si depositano campioni biologici preventivamente trattati con boro. I rivelatori sono poi esposti a un fascio di neutroni termici. La cattura neutronica libera le particelle

cariche che percorrono una traiettoria all'interno del rivelatore, causando dei danni lungo il loro percorso e lasciando delle tracce latenti dell'ordine dei nanometri, non visibili. Successivamente, il rivelatore viene sottoposto ad attacco chimico con una soluzione corrosiva che rende le tracce latenti visibili e fotografabili al microscopio ottico. Avvalendosi dell'autoradiografia neutronica, è stata calcolata la dose di radiazioni assorbita dai campioni trattati con boro nei vari esperimenti.

Inoltre, è stato effettuato un irraggiamento dei campioni, presso il Policlinico San Matteo, con una sorgente di fotoni di riferimento, utilizzando (**Raycell® Mk2 X-ray**) un radiatore a raggi-x dotato di due fasci di fotoni di energia media compresa tra 60 e 80 KeV.

I campioni RHE sono stati sottoposti a dosi crescenti espresse in Gy e con margine di errore al 5%. Le dosi sono riportate nella seguente tabella:

NUMERO DI IRRAGGIAMENTO	DOSE ASSORBITA (Gy)
1	6.0 ± 0.3
2	12.0 ± 0.6
3	24 ± 1
4	36 ± 2
5	108 ± 5

La dose di radiazioni assorbite dai costrutti RHE durante l'irraggiamento neutronico in assenza di boro è stata calcolata mediante la simulazione di Monte Carlo, utilizzando la versione 6.1 del codice MNCP. La simulazione MNCP permette di calcolare la dose di radiazioni assorbite all'interno di un volume desiderato, seguendo l'interazione di ogni particella e la deposizione di energia all'interno del volume selezionato.

4.4 Allestimento e preparazione dei campioni RHE su vetrini portaoggetti

Alla fine dei prestabiliti tempi di osservazione, parte dei costrutti RHE sono stati fissati per poter essere sottoposti alle analisi istologiche. È stato adottato il protocollo di allestimento di un comune preparato istologico.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- fissazione
- disidratazione
- inclusione
- sezionamento
- montaggio

La **fissazione** è una delle fasi più importanti. Vengono utilizzati composti chimici come alcol e formalina che evitano la decomposizione tissutale preservandone lo stato istoarchiteturale. A tal proposito, i campioni sono stati sottoposti al processo di fissazione con la formalina al 10%, a cui è seguita la fase di **disidratazione**.

I campioni sono stati disidratati immergendoli per tempi diversi in una serie di soluzioni a concentrazioni di alcol

- soluzione 50% acqua 50% alcol per 1 ora.
- soluzione 30% acqua 70% alcol per 1 ora e 30 minuti.
- Soluzione 20% acqua 80% alcol *overnight*.
- Soluzione 5% acqua 95% alcol per 2 ore
- 100% alcol per 3 ore.

Successivamente i campioni sono stati lavati in xilene per 30 minuti e depositati in cassetine appropriate per poter essere immerse in contenitori contenenti la cera di paraffina riscaldata a 48 °C per 1 ora e a 58 °C *overnight*.

Il giorno seguente i campioni, contenuti nelle cassetine, sono stati posizionati su appositi supporti in metallo contenenti la paraffina liquida e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Avvenuta la solidificazione della paraffina è stato possibile distaccare i campioni dalla struttura di supporto completando così la fase di **inclusione** dei campioni in blocchetti di paraffina, materiale rigido che funge da supporto per il successivo sezionamento dei tessuti. Il **sezionamento** è stato eseguito utilizzando il microtomo. Prima di eseguire il taglio, i blocchetti di paraffina sono stati posizionati ed

orientati in modo tale da ottenere fette di tessuto trasversali (campione RHE), con sezioni che includono tutto lo spessore del costrutto e presentanti tutti gli strati dell'epidermide. Il microtomo è stato calibrato in modo tale da ottenere delle sezioni spesse 6-7µm. Le fettine di tessuto, ancora in paraffina, ottenute dal taglio con microtomo, sono state

depositate in un bagnetto termoregolato per distenderle completamente e completare l'ultima fase del protocollo con la raccolta e l'adesione su vetrini portaoggetto.

4.5 Colorazione ematossilina-eosina

Questa tecnica di colorazione bicromica è la più comune colorazione istologica, utilizzata prevalentemente in microscopia ottica ed applicabile a tutti i campioni fissati con la maggior parte dei fissativi, eccetto quelli che prevedono la presenza di osmio. Questo tipo di colorazione consente di osservare la struttura generale dei tessuti; l'utilizzo di due coloranti diversi tra loro consente di evidenziare distintamente i costituenti di una cellula, basandosi sui diversi valori di pH degli organelli cellulari. La colorazione ematossilina-eosina è definita bicromica, in quanto vi è la combinazione dei due coloranti: **ematossilina** ed **eosina**. L'ematossilina è un colorante basico, colora in blu-viola le componenti cariche negativamente (basofile), quali gli acidi nucleici, presenti al livello del nucleo. L'eosina è un colorante acido, colora in rosso-rosa le componenti cariche positivamente (acidofile), quali proteine cellulari, presenti a livello citoplasmatico.

Per la colorazione con ematossilina-eosina, i vetrini sono stati immersi due volte nello xilene (**Bio-Optica**) per 5 minuti in modo da disciogliere la paraffina; i

in seguito, è stata eseguita la scala discendente di soluzioni alcoliche per reidratare i tessuti:

- 100% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 80% alcol per 5 minuti
- Acqua distillata per 5 minuti

Al termine del processo di reidratazione, i campioni sono stati immersi prima nell'ematossilina **Mayer** per 5 minuti, un lavaggio in acqua corrente per 15 minuti necessario per il viraggio del colorante in eccesso, e successivamente immersi in **eosina** per 1 minuto.

Dopo la colorazione bicromica, i campioni sono stati sottoposti a disidratazione eseguendo la scala ascendente di soluzioni alcoliche:

- Acqua distillata per 5 minuti
- 80% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 100% alcol per 5 minuti

Infine, sono stati eseguiti due lavaggi da 5 minuti in xilene per procedere con il montaggio dei vetrini con coprivetrini (vetrini coprioggetto) utilizzando un montante a base di balsamo (**DPX SIGMA**).

4.6 Acquisizione ed elaborazione delle immagini

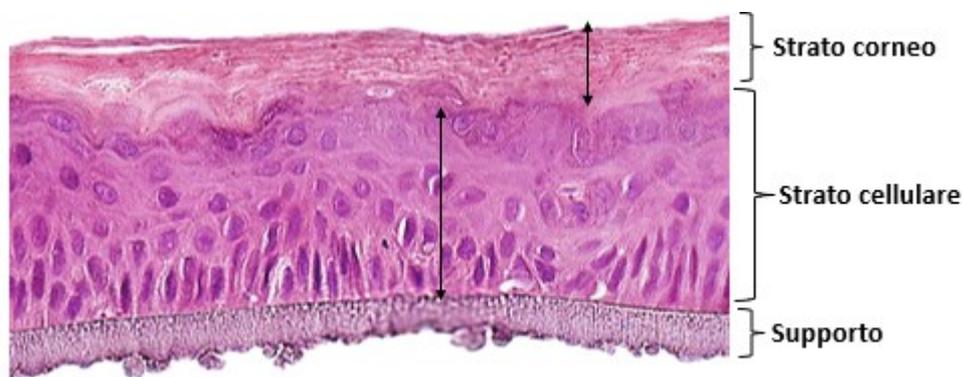


Fig. 7 Colorazione ematossilina-eosina di un campione RHE (immagine ottenuta con microscopio Zeiss Axiophot, ingrandimento 20X). L'immagine mostra la modalità di misurazione dello spessore corneo e dello strato cellulare, che compongono lo spessore epidermico totale. Lo spessore del supporto non è incluso nelle misurazioni ottenute.

I vetrini colorati e montati sono stati osservati al microscopio ottico Zeiss Axiophot (**Carl Zeiss, Oberkochen, G**) ad un ingrandimento 20X, per l'analisi morfologica dei campioni irraggiati in comparazione con i campioni controllo. Le immagini delle sezioni sono

state acquisite con la fotocamera digitale Coolpix 950 (**Nikon, Japan**) posizionata nell'apposito microscopio oculare.

Successivamente, le immagini sono state trasferite su un computer ed elaborate con il programma di elaborazione immagini *ImageJ*⁵. Questo *software* ha permesso di misurare lo spessore totale dei campioni RHE in micron. In ciascun campione è presente una variabilità istologica dovuta alla distribuzione non omogenea dello strato cellulare e dello strato corneo; per questo, stato necessario considerare i 2 *frame* più rappresentativi del costrutto, denominati come *frame 1* e *frame 2*. Per ogni *frame* sono state eseguite 3 misurazioni in punti diversi, sia dello strato cellulare sia del corneo. In seguito, sono state calcolate le medie dello strato cellulare e dello strato corneo del *frame 1* e del *frame 2*. Dalla media dei *frame*, è stato ottenuto il valore dello spessore totale del costrutto. Le immagini acquisite al 20x con la fotocamera digitale Coolpix 950 posizionata nell'apposito microscopio ottico, presentano la dimensione di (344 x 244) micron. Le stesse immagini caricate sul programma *ImageJ*⁵ presentano una dimensione di (2880 x 2048) *pixel*.

Le misurazioni, effettuate con la funzione “*Straight*” di *ImageJ*⁵, sono state ottenute in *pixel* e convertite in micron. La conversione da *pixel* a micron è stata calcolata eseguendo la proporzione:

$$x = \frac{244 (\mu\text{m}) \times \text{valore misura (pixel)}}{2048 (\text{pixel})}$$

x = valore della misura espressa in μm

I valori ottenuti sono stati riportati in fogli Excel per condurre analisi statistiche.

4.7 Immunoistochimica

Sono state condotte analisi e studi istologici applicando l'immunoistochimica per l'analisi dell'espressione e localizzazione di proteine tipiche della fase di differenziazione terminale epiteliale, in particolare la filaggrina, l'involucrina e le citocheratine.

Le tecniche di immunoistochimica sfruttano la capacità di legame specifico tra antigene e anticorpo, creando un complesso che viene visualizzato mediante metodiche di rivelazione con particolari marcatori.

L'identificazione di antigeni in sezioni di tessuto può avvenire mediante un metodo **diretto**: l'anticorpo può essere coniugato con molecole di dimensioni ridotte, i fluorocromi, che non determinano un'alterazione strutturale significativa dell'anticorpo. I fluorocromi sono anch'essi invisibili al microscopio, ma hanno una caratteristica: emettono fluorescenza se eccitati da radiazioni, come i raggi UV. In questo caso è necessario ricorrere all'utilizzo del microscopio a fluorescenza. Un secondo metodo diretto avviene coniugando l'anticorpo con un enzima, in questo caso il prodotto della reazione enzimatica evidenzia la localizzazione dell'antigene e l'osservazione del preparato può avvenire mediante un microscopio a luce visibile. È possibile utilizzare anche un metodo **indiretto**: l'anticorpo specifico verso l'antigene d'interesse viene evidenziato con un secondo anticorpo (marcato) che lo riconosce.

4.7.1 Saggio immunoistochimico per la rivelazione dell'espressione delle citocheratine

I campioni RHE sono stati sottoposti ad un saggio immunoistochimico (IHC) per la rivelazione dell'espressione e della localizzazione delle citocheratine 1 e 10. Le sezioni di tessuto sono incluse in paraffina e disposte su vetrini portaoggetto. Prima di procedere con l'immunomarcatura è stata rimossa la paraffina immergendo i vetrini 2 volte nello xilene per 5 minuti.

In seguito, è stata eseguita la scala discendente di soluzioni alcoliche per reidratare i tessuti:

- 100% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 80% alcol per 5 minuti
- Acqua distillata per 5 minuti

Al termine della scala, i vetrini sono stati inseriti all'interno di una camera umida e sottoposti al blocco delle perossidasi endogene con H₂O₂. Dopo 30 minuti, è stato eseguito un lavaggio con TBS per 5 minuti. In seguito, è stato utilizzato il kit MACH 1 Universal HRP-Polymer (**BIOCARE MEDICAL**), eseguendo un'incubazione con 150µL di una soluzione di bloccaggio (**Background Sniper**) dei siti antigenici aspecifici. Successivamente, è stata effettuata una incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con anticorpo primario anti-pan-CK di topo (**T1302 BMA Biomedicals**), diluito 1:200 in una goccia (150µL) di TBS. In seguito, sono stati effettuati, in sequenza, 3 lavaggi da 8 minuti in TBS in camera umida.

Terminati i lavaggi, è stata effettuata un'incubazione con 150µL di anticorpo secondario *multilink* (**MACH 1 Mouse Probe**) per 15 minuti. Al termine, sono stati eseguiti due lavaggi da 5 minuti in TBS, ai quali è seguita una incubazione con 150µL di (**HRP-Polymer**). Per la rilevazione dell'immunomarcatura, è stata sviluppata una reazione incubando una goccia (150µL) del cromogeno 3,3'-diamminobenzidina (**DAB**) diluita in 1 mL di substrato DAB per 4 minuti. Dopo 2 lavaggi da 5 minuti con acqua distillata, i campioni sono stati sottoposti a disidratazione eseguendo la scala ascendente di soluzioni alcoliche:

- 80% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 100% alcol per 5 minuti

Infine, sono stati eseguiti due lavaggi da 5 minuti nello xilene per procedere con il montaggio dei vetrini con coprivetrini (vetrini coprioggetto) utilizzando un montante a base di balsamo (**DPX SIGMA**). Al termine del seguente protocollo, i campioni RHE sono stati osservati al microscopio ottico (**Zeiss Axiophot**).

4.7.2 Saggio immunohistochimico per la rivelazione dell'espressione dell'involucrina

I campioni RHE sono stati sottoposti ad un saggio immunohistochimico (IHC) per la rivelazione della localizzazione e dell'espressione dell'involucrina. Il primo *step* è stato sciogliere la paraffina immergendo i vetrini 2 volte nello xilene per 5 minuti. In seguito, i tessuti sono stati reidratati eseguendo la scala discendente di soluzioni alcoliche:

- 100% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 80% alcol per 5 minuti
- Acqua distillata per 5 minuti

Successivamente, i vetrini sono stati posizionati all'interno di una camera umida e sottoposti al blocco delle perossidasi endogene con H₂O₂. Dopo 30 minuti, è stato eseguito un lavaggio con TBS per 5 minuti, a cui è seguita un'incubazione con anticorpo primario di topo anti-involucrina (**SIGMA I-9018 CLONE SY5**), diluito 1:100 in una goccia (150µL) di PBS per 24 ore alla temperatura di 4°C (campioni conservati in frigo). In seguito, sono stati effettuati, in sequenza, 3 lavaggi da 8 minuti in TBS in camera umida, a cui è seguita l'incubazione di 1 h con anticorpo secondario anti-*mouse* coniugato con fluorescina isotiocianato (**FITC**) diluito 1:200 in una goccia (150µL) di PBS a temperatura ambiente. [N.B. durante l'incubazione con l'anticorpo secondario FITC-coniugato, i vetrini sono stati tenuti in *dark conditions* al riparo dalla luce, per evitare che la fluorescenza decadesse]. Successivamente, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 8 minuti in TBS ed è stata eseguita una colorazione con Hoechst33258 (diluito 1:5000 in PBS non sterile), colorante fluorescente blu che permette la visualizzazione del nucleo cellulare legandosi al solco minore del DNA. La soluzione è stata versata all'interno di una patologica nella quale sono stati posizionati i vetrini e lasciati in incubazione per 5 minuti. Al termine della colorazione è stato eseguito un lavaggio da 5 minuti in TBS. Infine, i vetrini sono stati montati utilizzando il *mowiol* (un montante a base acquosa) e dopo 24 ore, sono stati osservati al microscopio in fluorescenza (**Zeiss Axiophot**).

4.7.3 Saggio immunohistochimico per la rivelazione dell'espressione della filaggrina

I campioni RHE sono stati sottoposti ad un saggio immunohistochimico (IHC) per la rivelazione della localizzazione e dell'espressione della filaggrina. È stato eseguito il processo di sparaffinatura immergendo i vetrini 2 volte nello xilene per 5 minuti.

In seguito, i tessuti sono stati reidratati eseguendo la scala discendente di soluzioni alcoliche

- 100% alcol per 5 minuti
- 96% alcol per 5 minuti
- 80% alcol per 5 minuti
- Acqua distillata per 5 minuti

Successivamente, i vetrini sono stati immersi in tampone citrato 0.01 M a pH 6 all'interno di una patologica in plastica e sottoposti al pretrattamento in microonde per 12 minuti, adottando la funzione del microonde "potenza massima". Al termine del pretrattamento necessario per lo smascheramento dei siti antigenici, è stata eseguita la fase di raffreddamento, immergendo i vetrini in un film di TBS. Dopo 20 minuti, è stato eseguito, in camera umida, il blocco delle perossidasi endogene con H₂O₂ per 30 minuti. Successivamente, è stato eseguito un lavaggio con TBS per 5 minuti, a cui è seguita un'incubazione con anticorpo primario *mouse* anti filaggrina (**Oncogene Cat #CP71**), diluito 1:200 in una goccia (150µL) di PBS *overnight* alla temperatura di 4°C (campioni conservati in frigo). In seguito, sono stati effettuati, in sequenza, 3 lavaggi da 8 minuti in TBS in camera umida, a cui è seguita una incubazione di 1 ora con anticorpo secondario anti-*mouse* coniugato con fluorescina isotiocianato (**FITC**) diluito 1:200 in una goccia (150µL) di PBS a temperatura ambiente. [N.B. durante l'incubazione con l'anticorpo secondario FITC-coniugato, i vetrini sono stati tenuti in *dark conditions* al riparo dalla luce, per evitare che la fluorescenza decadesse]. Successivamente, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 8 minuti in TBS ed è stata eseguita una colorazione con Hoechst33258 diluito 1:5000 in PBS non sterile; la soluzione è stata versata all'interno di una patologica nella quale sono stati posizionati i vetrini e

lasciati in incubazione per 5 minuti. Al termine della colorazione è stato eseguito un lavaggio da 5 minuti in TBS. Infine, i vetrini sono stati montati utilizzando il *mowiol*, e dopo 24 ore, sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (**Zeiss Axiophot**).

5 RISULTATI

5.1 Valutazione morfologica dei costrutti SkinEthic™ RHE

La tecnica di colorazione bicromica ematossilina-eosina, è stata eseguita sui campioni di tre differenti esperimenti, diversi per dose di radiazione assorbita, denominati in successione 1, 2 e 3. Il primo obiettivo è stato orientato ad analizzare morfologicamente i campioni sottoposti ad irraggiamento in assenza e in presenza di BPA) in comparazione con i campioni controllo (non irraggiati) e valutare eventuali alterazioni isto-architettureali dei costrutti. Inoltre, come descritto nel paragrafo 4.6, successivamente alla colorazione, è stato misurato (in micron) lo spessore epidermico di ciascun costrutto.

Nell'esperimento 1, il costrutto SkinEthic™ RHE è stato sottoposto a 2 condizioni di irraggiamento rispetto ad una condizione di controllo non irraggiato. Sono state ottenute tre tipologie di campioni: il controllo (**CTR**), l'irraggiato solo con i neutroni (**senza BPA**), l'irraggiato con boro (**con BPA**). Ciascun campione è stato valutato a 3 differenti tempi di osservazione (**T0, T2, T5**). In ciascun gruppo è possibile notare che il campione T0 ha uno spessore cellulare maggiore rispetto al T2 e T5, diversamente il T5 presenta uno spessore di strato corneo maggiore rispetto agli altri frammenti.

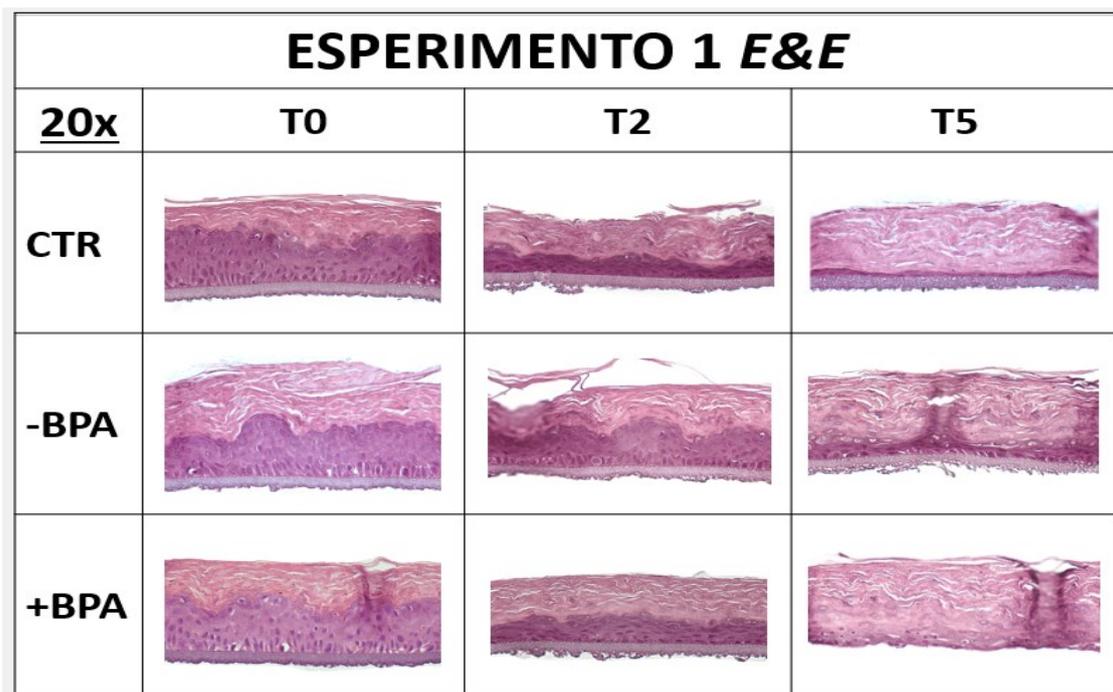


Fig. 8 Campioni RHE colorati con ematossilina-eosina (E&E): controllo (CTR), campioni senza boro (-BPA), campioni con boro (+BPA) ai tempi: T0, T2, T5. (ingr. ob. 20X).

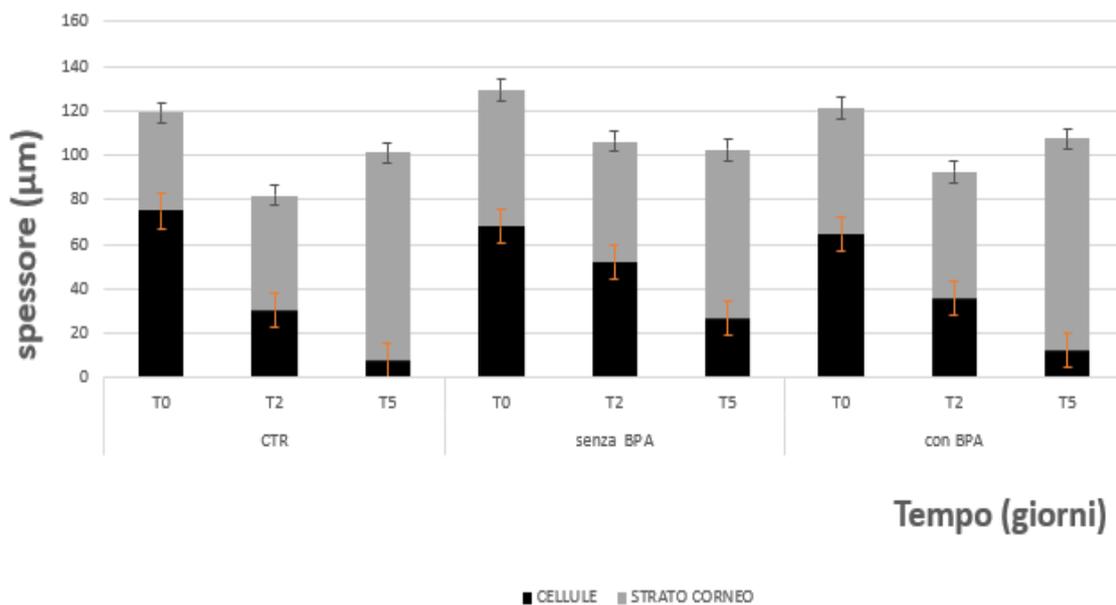


Fig. 9 Grafico relativo alla colorazione ematossilina-eosina dei campioni dell'esperimento 1. In ordinata la misura degli spessori dello strato cellulare e dello strato corneo (in µm), relativi ai costrutti RHE di controllo (CTR), senza boro (-BPA) e con boro (+BPA) ai tempi espressi in giorni (T0, T2, T5), riportati sull'asse delle ascisse.

Morfologicamente, il **T0 CTR** presenta un'epidermide costituita da uno strato basale rappresentato da cellule cilindriche ben compatte tra loro e adese al supporto, che mima la membrana basale; questa unica fila di cellule mostra uno spessore di circa 70 μm e una colorazione basofila dopo colorazione con ematossilina-eosina, essendo cellule con un'intensa attività protido-sintetica e proliferativa, (da cui deriva anche il nome di "strato germinativo"). Da quest'ultimo, originano le cellule degli strati sovrastanti, come lo strato spinoso e granuloso. Nel campione **T0 CTR** lo strato spinoso in questione mostra 4 file di cellule con forma prismatica e costituiscono lo spessore cellulare maggiore dell'epidermide. Lo strato granuloso sovrastante è costituito da un singolo strato di cellule basofile contenenti granuli. Sono evidenti cellule appiattite che vanno incontro al processo di citomorfosi cornea, con la formazione di scaglie di cheratina che costituiscono lo strato corneo acidofilo; lo spessore è integro e misura circa 50 μm .

Analizzando la morfologia del campione **T0 senza BPA**, in comparazione con il campione T0 CTR, è possibile osservare uno strato basale costituito da un'unica fila di cellule con una forma meno cilindrica e più allungata. Lo strato spinoso è costituito sempre da 4 file di cellule con forma prismatica; nelle ultime due file di cellule più superficiali è possibile riscontrare la presenza di spazi bianchi otticamente visibili (indice probabilmente di degenerazione cellulare), riscontrati anche nell'unica fila di cellule dello strato granuloso. Lo strato corneo ha uno spessore maggiore, di circa 10 μm e costituito da strati cheratinizzati sovrapposti ma poco adesi, con un maggior grado di sfaldamento (sono presenti spazi otticamente vuoti).

Il **T0 BPA**, considerando le caratteristiche morfologiche del T0 CTR, manifesta uno strato basale con cellule caratterizzate dall'interposizione di spazi otticamente vuoti. (tappeto di cellule poco adese tra di loro, suddivise da spazi vuoti). Lo strato spinoso è costituito da una scarsa quantità di cellule, isolate tra loro, con morfologia tondeggiate e non prismatica bensì una forma più tondeggiate. Lo strato corneo è integro, con uno spessore di circa 5 μm .

Il **T2 CTR** presenta uno spessore cellulare di circa 30 μm micron, inferiore rispetto lo spessore dello strato corneo; lo strato basale è formato da cellule poco adese al supporto, appiattite, poco voluminose e con la perdita della tipica forma cilindrica. Quest'aspetto morfologico sembra conservarsi anche negli strati cellulari sovrastanti, facendo ipotizzare una degenerazione dell'intera componente cellulare dell'epidermide. Tale condizione morfologica è riscontrata anche nell'immagine del **T2 BPA**. Questo non viene evidenziato nel **T2 senza BPA** che, diversamente, presenta un'integrità dell'intero spessore cellulare e gli strati sono ben distinguibili. Il campione **T5 CTR** mantiene un'epidermide quasi totalmente costituita da strato cheratinizzato, con un'unica fila di cellule appiattite. Una condizione analoga è rappresentata nell'immagine del **T5 senza BPA**, con un'unica differenza: le cellule dello strato basale hanno una forma più allungata e la presenza di un'unica fila di cellule dello strato spinoso. Il campione **T5 BPA** presenta un'epidermide totalmente cheratinizzata con poche cellule tondeggianti sparse nello strato più interno.

Nell'esperimento 2 e nell'esperimento 3, il costrutto SkinEthic™ RHE è stato sottoposto alle medesime condizioni di trattamento descritte nell'esperimento 1. Inoltre, per ciascun campione ottenuto, è stata valutata una cinetica temporale considerando 4 differenti tempi (**T0, T2, T5 e T7**).

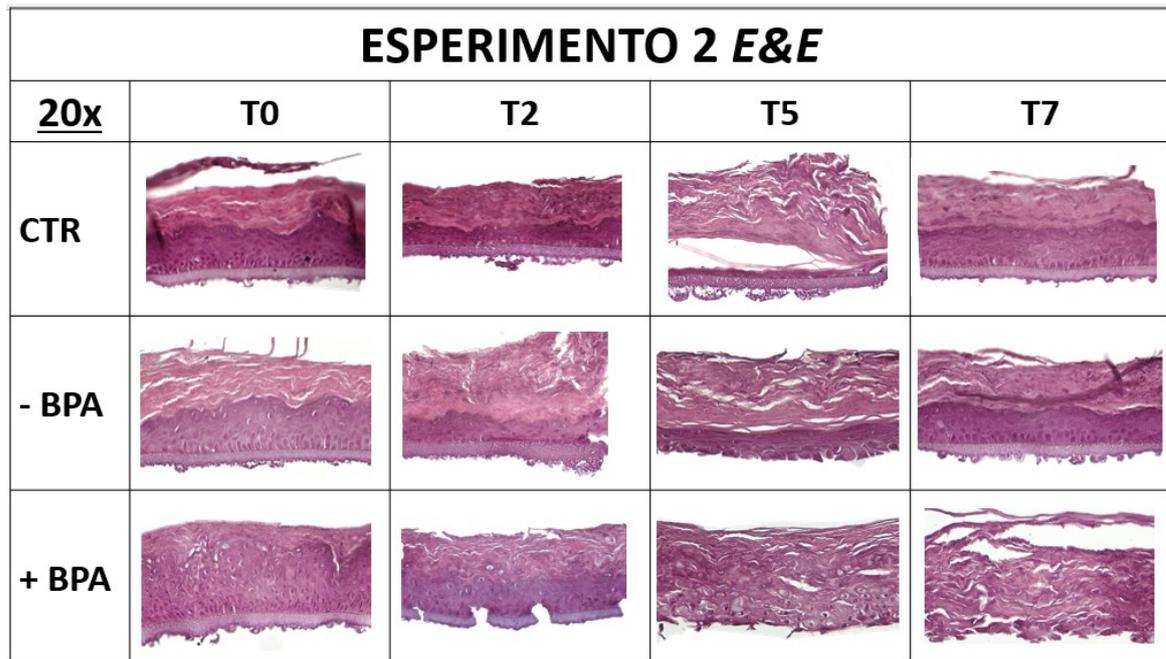


Fig. 10 Campioni RHE colorati con ematossilina-eosina (E&E): controllo (CTR), campioni senza boro (-BPA), campioni con boro (+BPA) ai tempi: T0, T2, T5, T7. (ingr. ob. 20X).

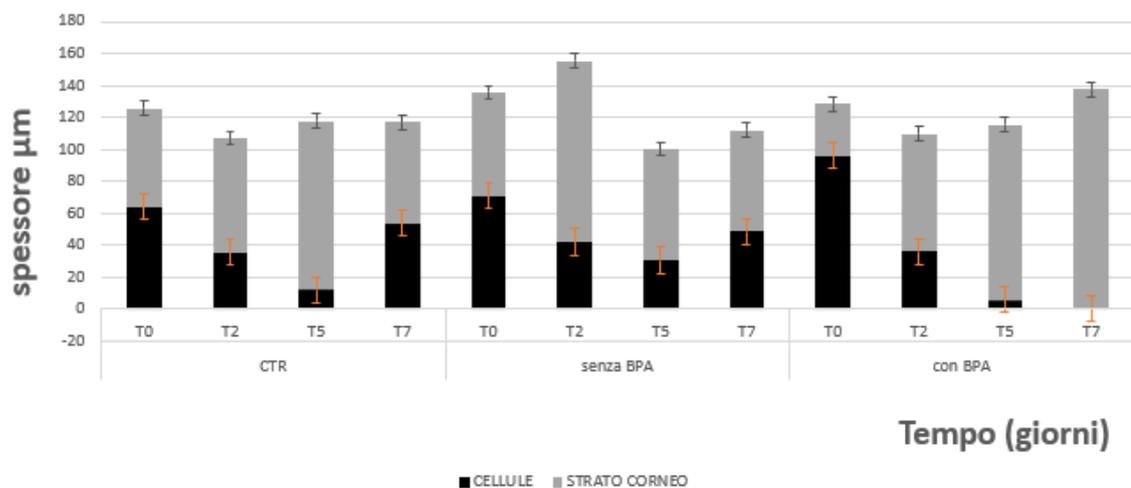


Fig.11 Grafico relativo alla colorazione ematossilina-eosina dei campioni dell'esperimento 1. In ordinata la misura degli spessori dello strato cellulare e dello strato corneo (in μm), relativi ai costrutti RHE di controllo (CTR), senza boro (-BPA) e con boro (+BPA) ai tempi espressi in giorni (T0, T2, T5, T7), riportati sull'asse delle ascisse.

Nell'esperimento 2, all'interno del gruppo CTR e senza BPA, il campione T0 presenta lo spessore cellulare maggiore rispetto gli altri frammenti con tempistiche diverse e

l'intero spessore dell'epidermide è formato dal 50% di strato cellulare e 50% di strato cheratinizzato. E' possibile osservare che a 7 giorni di mantenimento in coltura, il campione T7 presenta uno spessore cellulare maggiore del T2 e del T5. All'interno del gruppo con BPA: il T0 mostra un'epidermide costituita per gran parte dalla componente cellulare, e il campione T7 possiede uno spessore epidermico completamente cheratinizzato, con la perdita della componente cellulare.

Il **T0 CTR** presenta uno spessore cellulare di circa 60 μm , in cui è possibile evidenziare: uno strato basale formato da un'unica fila di cellule, con forma prismatica e allungata differente e alcune cellule con forma più tondeggianti e maggiormente adese alla membrana basale. Lo strato spinoso è formato da più file di cellule con nuclei basofili. Lo strato granuloso è poco rappresentato, è possibile distinguere solo poche cellule con la tipica granulazione citoplasmatica. Lo strato corneo presenta molteplici strati di frammenti cellulari e scaglie di cheratina che compongono uno spessore di circa 60 μm , dimensioni analoghe allo spessore della componente cellulare.

Il **T0 senza BPA**, confrontato con il campione T0 CTR, manifesta uno strato basale più uniforme, con cellule molto allungate che sembrano distaccarsi dal supporto. Lo strato spinoso è costituito da più file di cellule; quelle maggiormente a ridosso dello strato granuloso perdono la forma prismatica manifestando degli spazi vuoti ben visibili. Lo strato corneo presenta più strati cheratinizzati poco compattati tra loro.

IL T0 con BPA presenta uno spessore cellulare di circa 100 μm ed è possibile evidenziare uno strato basale morfologicamente analogo al T0 CTR. Diversa situazione è visibile negli strati intermedi, formati da un numero maggiore di cellule poco organizzate in file e con forma ovoidale (non presentano le caratteristiche morfologiche tipiche degli strati intermedi dell'epidermide).

All'interno del gruppo **CTR**, il campione **T7** sembra essere il frammento di SkinEthic™ RHE con una morfologia più simile al campione T0; infatti, è possibile notare come la componente cellulare presenti uno spessore di circa 60 μm , pari alla componente cheratinizzata. Lo strato basale è ben strutturato e identificabile, con una fila di cellule allungate; gli strati intermedi sono formati da più file di cellule; nella fila più profonda è possibile notare maggiormente una forma cellulare prismatica che viene persa nelle

file superiori, dove le cellule assumono una forma più tondeggianti e degenerano originando lo strato più superficiale dell'epidermide. Quest'ultimo è costituito da scaglie cheratinizzate acidofile, di un colorito rosaceo. Il campione **T2** manifesta una componente cellulare poco delineata, con uno strato basale presentante cellule tondeggianti e uno strato corneo che appare come un blocco di strati cheratinizzati ben compatti e sovrapposti. Il **T5 CTR** ha subito una degradazione, mostrando una componente cellulare rappresentata, probabilmente, solo dallo strato basale distaccato dallo strato corneo. All'interno del gruppo **senza BPA** ciascun frammento (T0, T2, T5, T7) presenta lo stesso assetto morfologico dei campioni appartenenti al gruppo CTR.

Diversamente, il campione **T2 BPA** presenta una porzione della componente cellulare degradata e il resto dello spessore cellulare sembra conservare l'aspetto morfologico tipico dell'epidermide. Nell'immagine del **T5 BPA**, si osserva l'assenza quasi totale degli strati cellulari, con la presenza di cellule tondeggianti, con nucleo in fase di degenerazione. Il T7 mostra solamente lo strato corneo in via di degenerazione. Nell'esperimento 3, in ciascun gruppo, il campione T0 rappresenta il frammento con lo spessore cellulare maggiore.

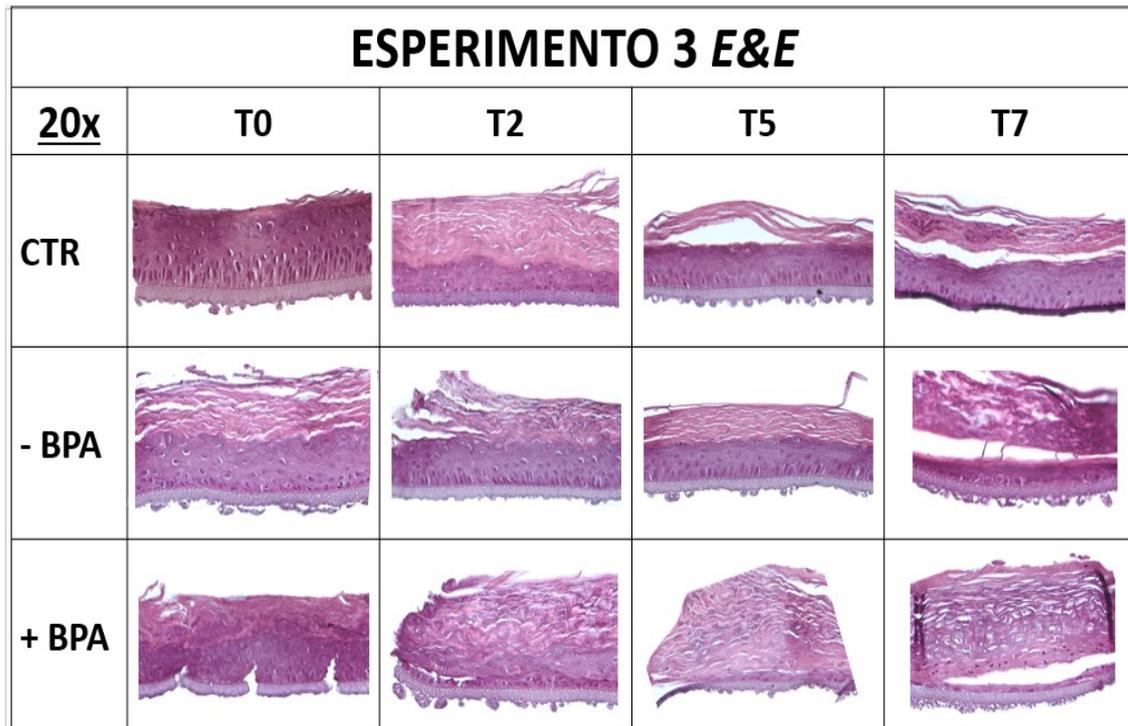


Fig. 12 Campioni RHE colorati con ematossilina-eosina (E&E): controllo (CTR), campioni senza boro (-BPA), campioni con boro (+BPA) ai tempi: T0, T2, T5, T7. (ingr. ob. 20X).

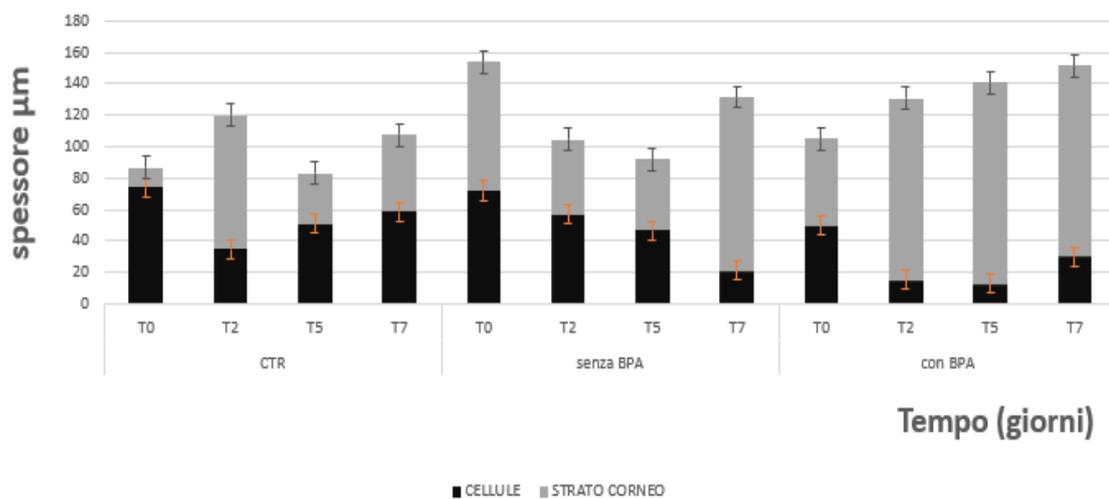


Fig.13 Grafico relativo alla colorazione ematossilina-eosina dei campioni dell'esperimento 1. In ordinata la misura degli spessori dello strato cellulare e dello strato corneo (in μm), relativi ai costrutti RHE di controllo (CTR), senza boro (-BPA) e con boro (+BPA) ai tempi espressi in giorni (T0, T2, T5, T7), riportati sull'asse delle ascisse.

Il **T0 CTR** ha uno spessore cellulare di circa 70 μm , quasi l'intero spessore del costrutto epidermico. Lo strato basale presenta un'alta densità di cellule cilindriche basofile che sembrano distaccarsi dallo strato sottostante; lo strato spinoso è costituito da 5 file di cellule di forma prismatica e in tutto lo spessore dello strato le cellule appaiono circondate da un alone bianco. L'ultima fila di cellule sembra insinuarsi all'interno dello strato granuloso; quest'ultimo è ben evidente con cellule appiattite e dense di granuli. Lo strato corneo è costituito da pochi strati di elementi cellulari degenerati, con uno spessore di circa 10 μm .

Il **T0 senza BPA** presenta uno spessore cellulare di circa 70 μm , e gli strati cellulari non sono ben definiti. Non tutte le cellule dello strato presentano una forma allungata ma numerose sembrano appiattirsi aderendo al supporto; gli strati intermedi presentano una bassa densità cellulare. Lo strato corneo è formato da molteplici strati di scaglie cheratinizzate e praticamente compatte.

Il **T0 BPA** presenta uno spessore cellulare di circa 60 μm , pari allo spessore dello strato corneo. Porzioni della componente cellulare risultano degradate, forse a causa di un errore di taglio del costrutto. La densità cellulare è elevata ed è difficile classificare e distinguere i vari strati. Lo strato più esterno dell'epidermide manifesta una buona integrità degli strati cheratinizzati che formano una massa omogenea e compatta.

Il **T2 CTR** e **T2 senza BPA** preservano la morfologia tipica dell'epidermide, il campione **T2 BPA** presenta uno strato basale con cellule appiattite, uno strato spinoso formato da un'unica fila di cellule. Lo strato granuloso presenta 2 file di cellule con aggregati granulari. Lo strato corneo rappresenta lo spessore maggiore dell'epidermide e dimensioni analoghe possono essere riscontrate nei campioni **T7 BPA** e **T5 BPA**. Quest'ultimo, diversamente dal T5 CTR e dal T5 senza BPA, presenta una componente cellulare costituita da un solo strato di cellule ovoidali e appiattite, probabilmente in fase di degenerazione.

Le immagini riferite ai campioni **T7 CTR**, **senza BPA** e **con BPA** mostrano il distacco della componente cellulare dallo strato corneo, caratteristica comune a tutti 3 i campioni.

5.2 Valutazione e analisi delle alterazioni isto-architeturali dei costrutti RHE

Il saggio immunohistochimico per la rivelazione delle pan-citocheratine è stato eseguito su campioni degli 1, 2 e 3, con lo scopo di valutare eventuali alterazioni del processo di differenziazione epiteliale dei costrutti RHE irraggiati esclusivamente con neutroni e irraggiati con BPA, in comparazione con i campioni controllo. Le citocheratine sono le proteine caratteristiche dei cheratinociti epidermici e la loro quantità aumenta progressivamente durante il differenziamento delle cellule, sino a costituire la componente maggiormente presente nelle cellule epiteliali completamente differenziate. Il passaggio di un cheratinocita dallo strato basale a quello spinoso, e quindi l'inizio del suo differenziamento, è caratterizzato dalla sintesi di tonofilamenti costituiti dalla coppia di cheratine (K1-K10).

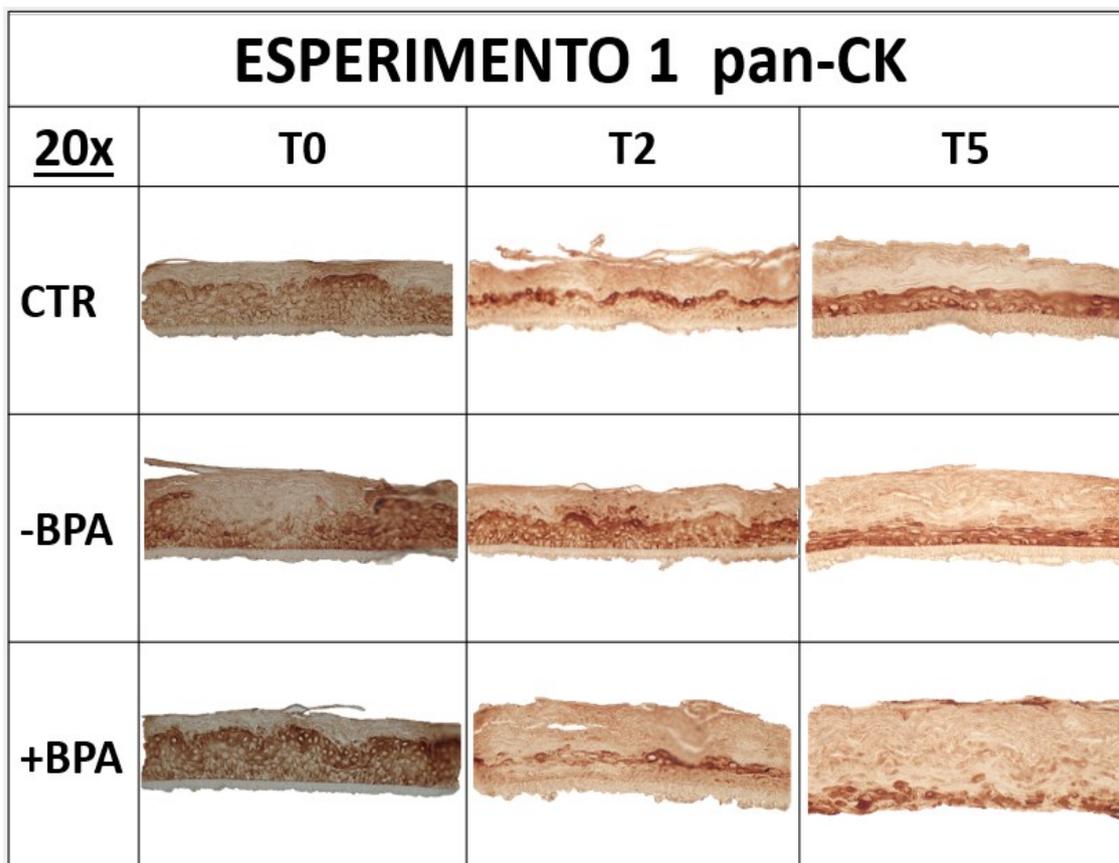


Fig. 14 Immagini in luce trasmessa (ingr. ob. 20X) dopo saggio immunohistochimico (IHC) per la rivelazione delle pan-citocheratine (pan-CK) dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5. La colorazione marrone è prodotta dalla reazione sviluppata con il cromogeno DAB.

Nell'esperimento 1, il costrutto SkinEthic™ RHE è stato sottoposto a 2 condizioni di irraggiamento rispetto ad una condizione di controllo nonirraggiato. Sono state ottenute tre tipologie di campioni: il controllo (**CTR**), l'irraggiato solo con neutroni (**senza BPA**), l'irraggiato con boro (**con BPA**). Ciascun campione è stato valutato a 3 differenti tempi di osservazione (**T0, T2, T5**). L'analisi del saggio immunohistochimico è avvenuta mediante l'osservazione con ingrandimento 20X al microscopio ottico. Le pan-citocheratine sono state evidenziate con un prodotto di reazione marrone.

Nel campione **T0 CTR** è possibile apprezzare una debole marcatura, con una distribuzione poco omogenea al livello delle cellule più superficiali dello strato granuloso. Diversamente, nel **T2 CTR** è possibile osservare nelle ultime due file di cellule dello strato granuloso una maggiore intensità e una distribuzione più omogenea di marcatura. Il **T5 CTR** presenta una marcatura diffusa in tutti gli strati cellulari dell'epidermide. I campioni **T0** e **T5** non trattati (**senza BPA**) presentano delle analogie con i campioni CTR corrispondenti. Il campione **T2 senza BPA**, in comparazione con il **T2 CTR**, presenta una marcatura diffusa in tutti gli strati sovrabasali, con una maggior intensità localizzata solo ad una porzione-sezione dell'ultimo strato di cellule granulose. Il **T0 BPA** manifesta una distribuzione, una localizzazione e una intensità di marcatura analoga al campione **T0 CTR**. Stessa analogia riscontrata confrontando il **T2 BPA** con il campione **T2 CTR**, eccetto per l'intensità di marcatura, meno intensa nello strato granuloso del **T2 BPA**. Infine, il campione **T5 senza BPA** mantiene un'epidermide costituita quasi totalmente da strato cheratinizzato, con una marcatura intensa ed omogenea diffusa in tutto lo strato cellulare.

Nell'esperimento 2 e nell'esperimento 3, il costrutto SkinEthic™ RHE è stato sottoposto alle medesime condizioni di trattamento descritte nell'esperimento 1. Inoltre, ciascun campione ottenuto, è stato valutato a 4 differenti tempi di osservazione (**T0, T2, T5 e T7**).

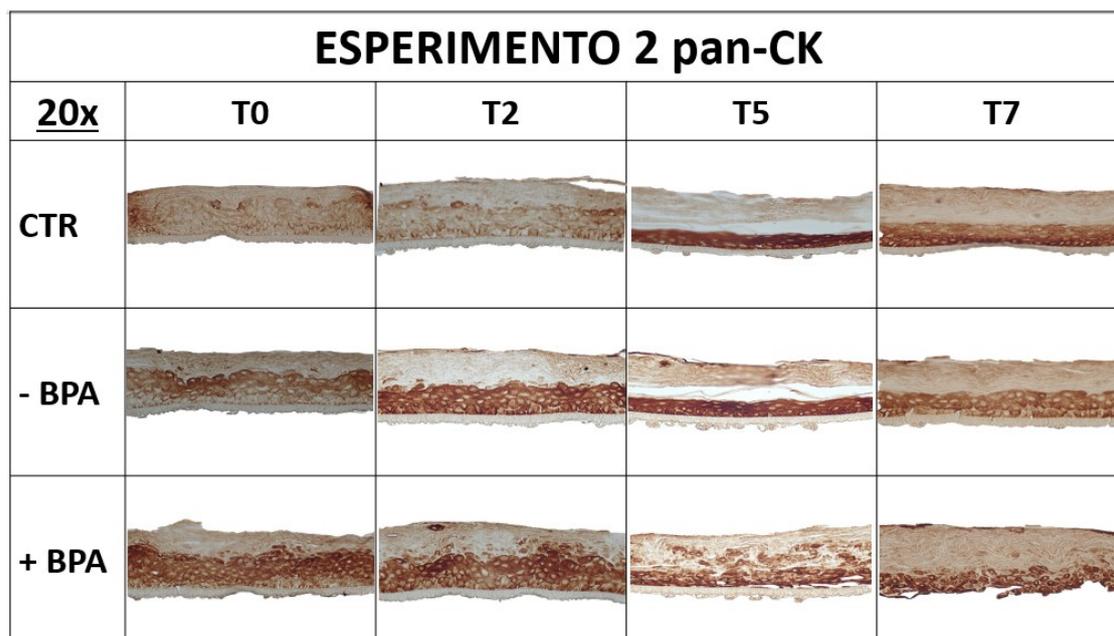


Fig. 15 Immagini in luce trasmessa (ingr. ob. 20X) dopo saggio immunohistochimico (IHC) per la rivelazione delle pan-citocheratine (pan-CK) dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 e T7 (esperimento 2). La colorazione marrone è prodotta dalla reazione sviluppata con il cromogeno DAB.

Nell'esperimento 2: i campioni **T0 CTR** e **T2 CTR** presentano una marcatura poco intensa e localizzata al livello del primo strato cellulare dello strato spinoso e nella fila di cellule più superficiale dello strato granuloso, a ridosso dello strato corneo. Diversamente, i campioni **T5 CTR** e **T7 CTR** presentano una marcatura più intensa e diffusa in tutta la componente cellulare: al livello dello strato basale e negli strati intermedi. Una localizzazione e intensità di marcatura analoga è riscontrata nel campione **T5 senza BPA** in comparazione con il T5 CTR e nel campione **T7 senza BPA** in comparazione con il T7 CTR. Il **T0 senza BPA** presenta una marcatura poco intensa diffusa negli strati intermedi. Nel campione **T2 senza BPA** si osserva una marcatura molto intensa localizzata in tutto lo spessore cellulare. I campioni **T0 BPA** e **T2 BPA** presentano una marcatura diffusa in tutta la componente cellulare, meno intensa al livello dello strato basale e spinoso e più intensa e omogenea a livello dello strato granuloso. Entrambi i campioni **T5 BPA** e **T7 BPA** presentano un'epidermide quasi

totalmente cheratinizzata, ma allo stesso tempo, si evidenzia una marcatura diffusa in tutta la componente cellulare.

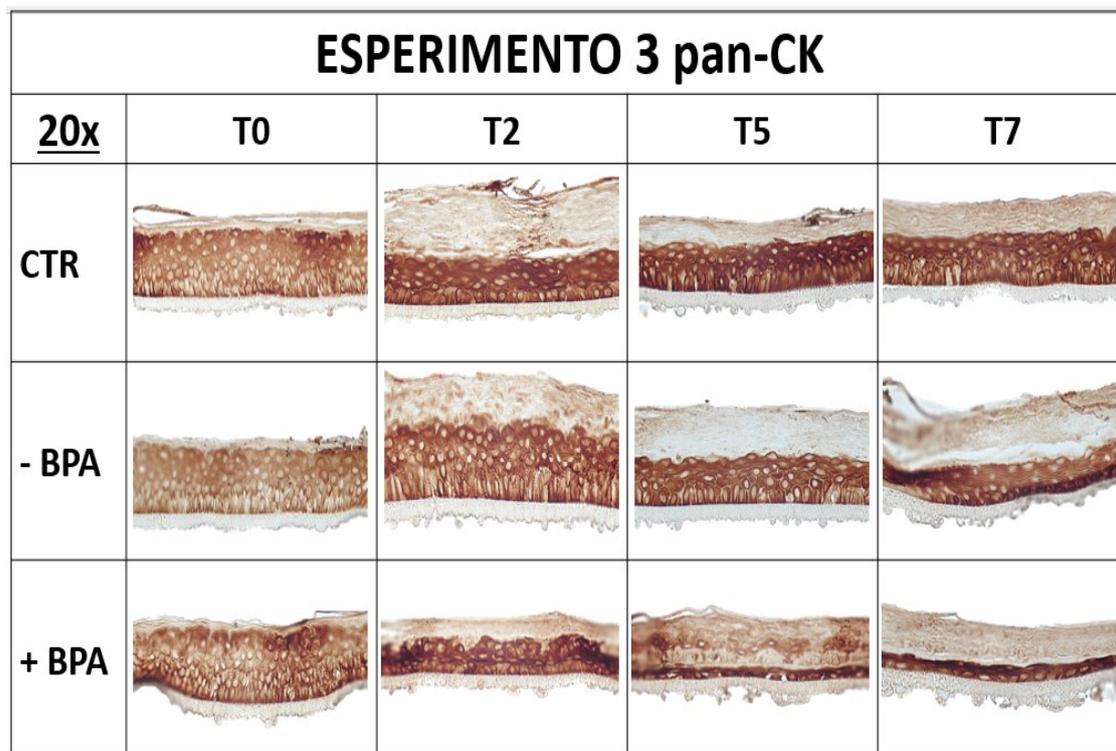


Fig. 16 Immagini in luce trasmessa (ingr. ob. 20X) dopo saggio immunocistochemico (IHC) per la rivelazione delle pan-citocheratine (pan-CK) dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 e T7 (esperimento 3). La colorazione marrone è prodotta dalla reazione sviluppata con il cromogeno DAB.

Nell'esperimento 3, è possibile osservare una minore variabilità tra i vari campioni, in termini di localizzazione e intensità di marcatura. Difatti, i campioni **T2 (CTR, senza BPA, con BPA) T5 (CTR, senza BPA, con BPA) T7 (CTR, senza BPA, con BPA)** presentano tutti una stessa intensità e distribuzione omogenea di marcatura al livello di tutta la componente cellulare. Diversamente, i campioni **T0 (CTR, senza BPA, con BPA)** in comparazione con i restanti campioni, presentano una intensità di marcatura inferiore, con una maggior espressione di citocheratine nello strato granuloso.

Sempre con lo scopo di valutare eventuali alterazioni del processo di differenziamento epiteliale dei campioni RHE irraggiati con BPA e senza BPA, in comparazione con i campioni controllo, è stato effettuato un saggio immunocistochemico (IHC) per la rivelazione della localizzazione e dell'espressione della filaggrina una proteina ricca di

istidina, capace di aggregare in macrofibrille i fasci paralleli di filamenti di cheratina. La stretta aggregazione dei filamenti di cheratina ad opera delle filaggrine provoca il collasso del citoscheletro del cheratinocito granuloso che termina il processo di differenziamento diventando un corneocito dello strato squamoso.

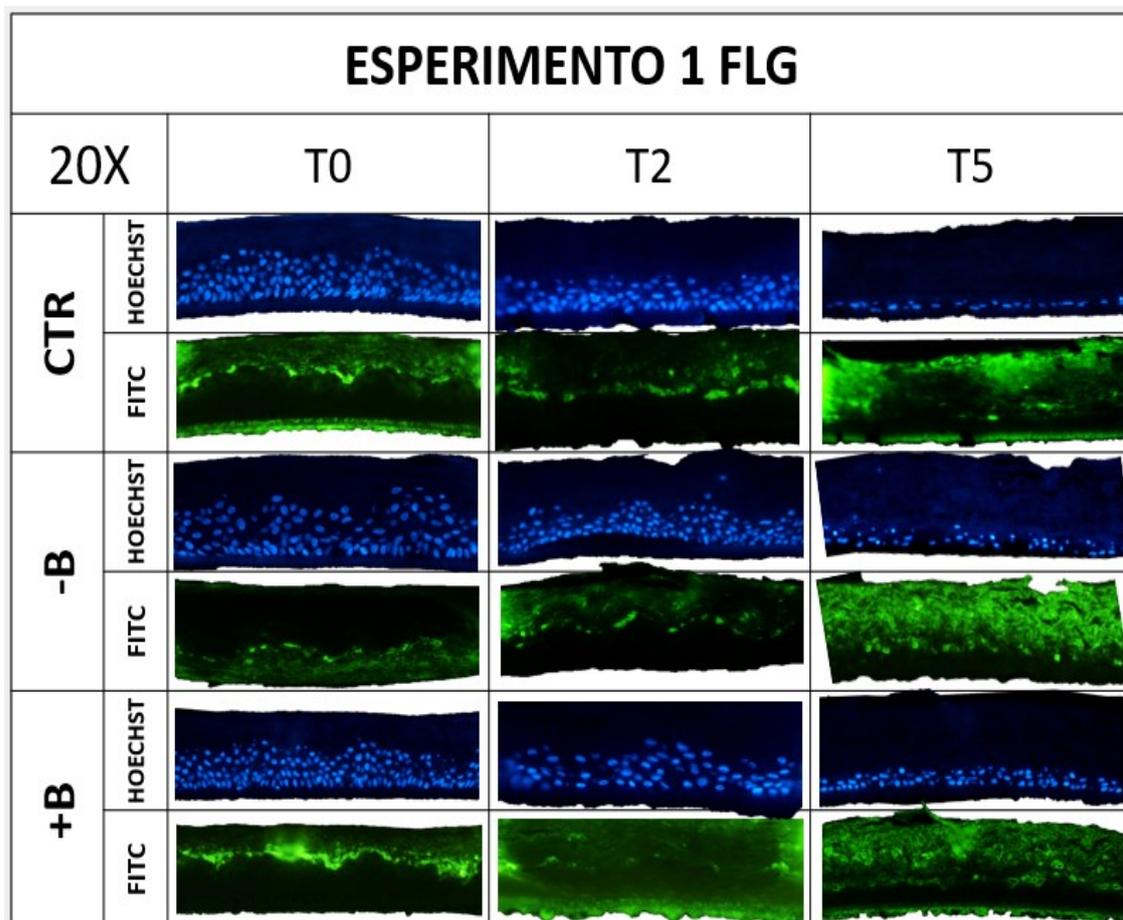


Fig. 17 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) relative al saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione dell'espressione di filaggrina (FLG) nei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 (esperimento 1). La filaggrina è marcata con anticorpo primario associato ad anticorpo secondario FITC coniugato (fluorescenza verde); i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

L'analisi del saggio immunostochimico è avvenuta mediante l'osservazione con ingrandimento al 20X al microscopio a fluorescenza. Le filaggrine sono state evidenziate con una fluorescenza di colore verde emessa dalla fluorescina isotiocianato (FITC) coniugata all'anticorpo secondario utilizzato. Inoltre, mediante una colorazione

con Hoechst33258, che emette una fluorescenza nel blu, sono stati osservati i nuclei cellulari. E' stato possibile osservare lo strato cellulare dei costrutti RHE e successivamente l'espressione e la localizzazione delle filaggrine marcate tramite emissione di fluorescenza.

Nell'esperimento 1, i campioni **T0 CTR** e **T2 CTR** presentano una intensità di fluorescenza uniforme e ben evidente a livello dello strato granuloso, proprio a ridosso dello strato corneo. Diversamente, il campione **T5 CTR** presenta una componente cellulare costituita da un solo strato cellulare che non esprime filaggrina. Una condizione analoga al campione T5 CTR, in termini di localizzazione di marcatura e di espressione di fluorescenza è riscontrata nel campione **T5 BPA**. Il campione **T0 BPA** presenta un'intensità di fluorescenza distribuita in maniera omogenea a livello dell'intero strato granuloso. Il campione **T2 BPA**, in comparazione con il T2 CTR, presenta una marcatura analoga in termini di localizzazione, ma con un'intensità di fluorescenza inferiore. I campioni **T0 senza BPA** e **T2 senza BPA**, In comparazione con i campioni controllo T0 e T2, mostrano un'emissione di fluorescenza concentrata solo in alcune porzioni dello strato granuloso. Il campione **T5 senza BPA**, confrontato con il T5 CTR, presenta una maggior componente cellulare e una fluorescenza poco evidente nello strato granuloso.

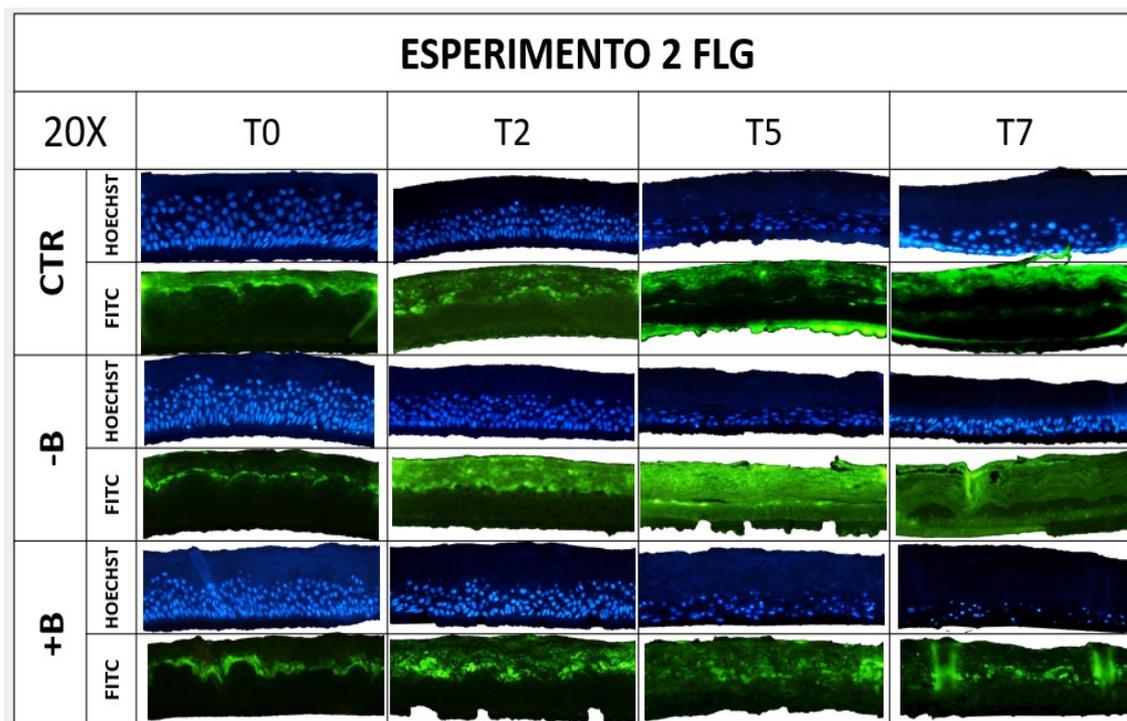


Fig.18 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) relative al saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione dell'espressione di filaggrina (FLG) nei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 (esperimento 1). La filaggrina è marcata con anticorpo primario associato ad anticorpo secondario FITC coniugato (fluorescenza verde); i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Nell'esperimento 2, è possibile osservare un'analogia tra i campioni **T0 CTR** e **T0 senza BPA** in termini di intensità e localizzazione di fluorescenza. In entrambi i campioni è possibile osservare una marcatura localizzata a livello dell'ultima fila di cellule dello strato granuloso, definendo l'inizio dello strato corneo e del processo di differenziazione terminale. Il campione **T0 BPA**, in comparazione con il T0 CTR, presenta un'intensità di fluorescenza maggiore. Nel campione **T2 CTR**, è possibile osservare nello strato granuloso, una leggera fluorescenza distribuita in maniera poco omogenea, intervallata da porzioni in cui non si evidenzia la marcatura. Il **T2 BPA**, confrontato con il T2 CTR, presenta una marcatura uniforme e più intensa diffusa in tutto lo strato granuloso. Inoltre, è possibile evidenziare una marcatura anche a livello del primo strato cheratinizzato. Nel **T2 senza BPA**, è possibile evidenziare una fluorescenza diffusa in tutto lo strato corneo, determinandone un grado di difficoltà

nel rilevare una potenziale marcatura a livello delle ultime file di cellule dello strato granuloso. Nei campioni **T5 CTR** e **T7 CTR**, è possibile osservare un'assenza, quasi totale, di marcatura. Il **T5 senza BPA**, in comparazione con il T5 CTR, presenta una marcatura più uniforme diffusa nello strato granuloso. Il **T7 senza BPA** non presenta alcuna marcatura. I campioni **T5 BPA** e **T7 BPA**, così come i rispettivi campioni controllo, presentano una marcatura quasi completamente assente.

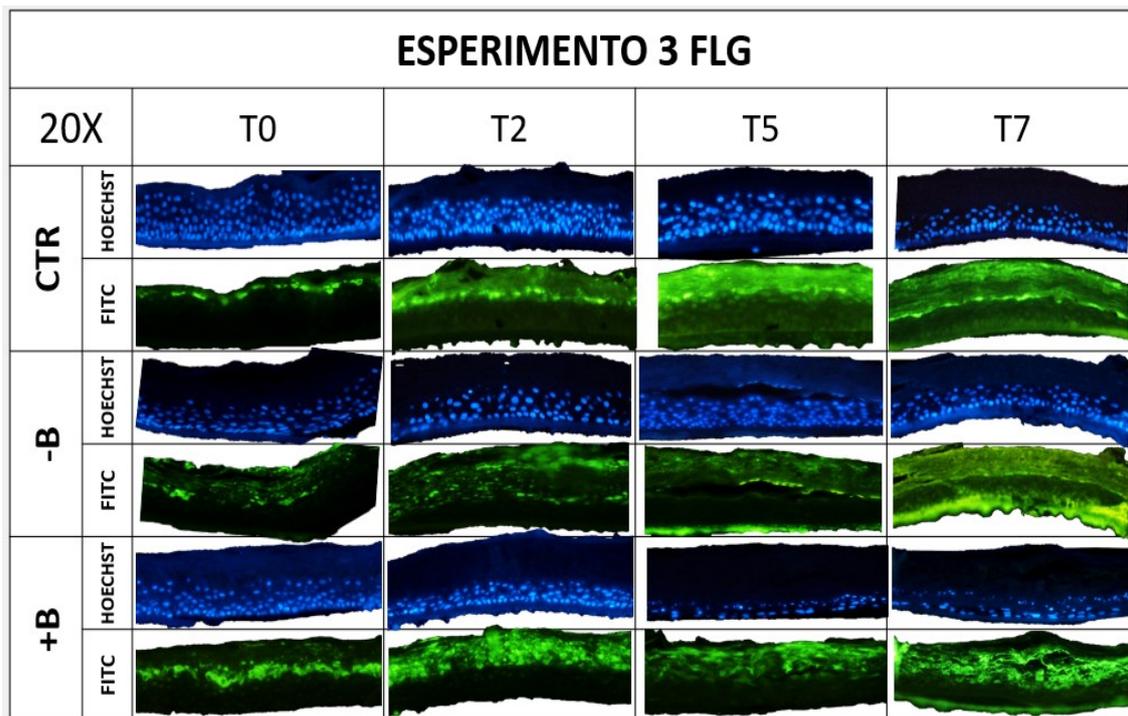


Fig.19 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) relative al saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione dell'espressione di filaggrina (FLG) nei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 (esperimento 3). La filaggrina è marcata con anticorpo primario associato ad anticorpo secondario FITC coniugato (fluorescenza verde); i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Nell'esperimento 3, tutti i campioni **controllo (T0, T2, T5, T7)** presentano una intensità di fluorescenza ben evidente e distribuita con uniformità a livello dello strato granuloso, proprio a ridosso dello strato corneo. Il campione **T0 BPA**, in comparazione con il T0 CTR, presenta un'intensità di fluorescenza maggiore. Nei campioni **T2 BPA, T5 BPA** e **T7 BPA**, è difficile osservare una marcatura a livello dello strato granuloso. L'analisi è condizionata dall'emissione di fluorescenza rilevata all'interno di tutta la componente cheratinizzata di tali campioni. Il campione **T0 senza BPA** presenta

un'intensità di fluorescenza distribuita in maniera poco omogenea a livello dell'intero strato granuloso. Nei campioni **T2 senza BPA** e **T5 senza BPA**, è possibile osservare un'assenza, quasi completa, di marcatura nello strato granuloso. Inoltre, è possibile osservare la fluorescenza in alcuni degli strati cheratinizzati del corneo. Il T7 senza BPA, in comparazione con il T7 CTR, presenta una medesima distribuzione di marcatura a livello dello strato granuloso, ma di minore intensità in termini di fluorescenza.

E' stato effettuato un ulteriore saggio immunostochimico per la rivelazione e la localizzazione della involucrina ai fini di valutare eventuali alterazioni del processo di differenziazione epiteliale dei campioni RHE irraggiati con BPA e senza BPA, in comparazione con i campioni controllo. Le involucrine sono altre proteine *markers* di differenziazione terminale dei cheratinociti. Sono proteine prodotte negli strati sovrabasali, partendo dai cheratinociti dello strato spinoso, e si accumulano sulla faccia interna della membrana plasmatica di ciascun cheratinocito, contribuendo alla formazione dello strato corneificato. Alla formazione di questa struttura contribuiscono una varietà di proteine prodotte dai cheratinociti nei vari stadi del loro processo differenziativo, di cui le filaggrine e le involucrine sono le maggiori componenti.

L'analisi del saggio immunostochimico è avvenuta mediante l'osservazione con ingrandimento al 20X al microscopio a fluorescenza. Le involucrine sono state evidenziate con una fluorescenza di colore verde emessa dalla fluorescina isotiocianato (**FITC**) coniugata all'anticorpo secondario impiegato. Inoltre, mediante una colorazione con Hoechst33258, che emette una fluorescenza nel blu, sono stati osservati i nuclei cellulari. In questo modo, è stato possibile osservare la componente cellulare dei costrutti RHE e successivamente l'espressione e la localizzazione delle involucrine marcate mediante emissione di fluorescenza.

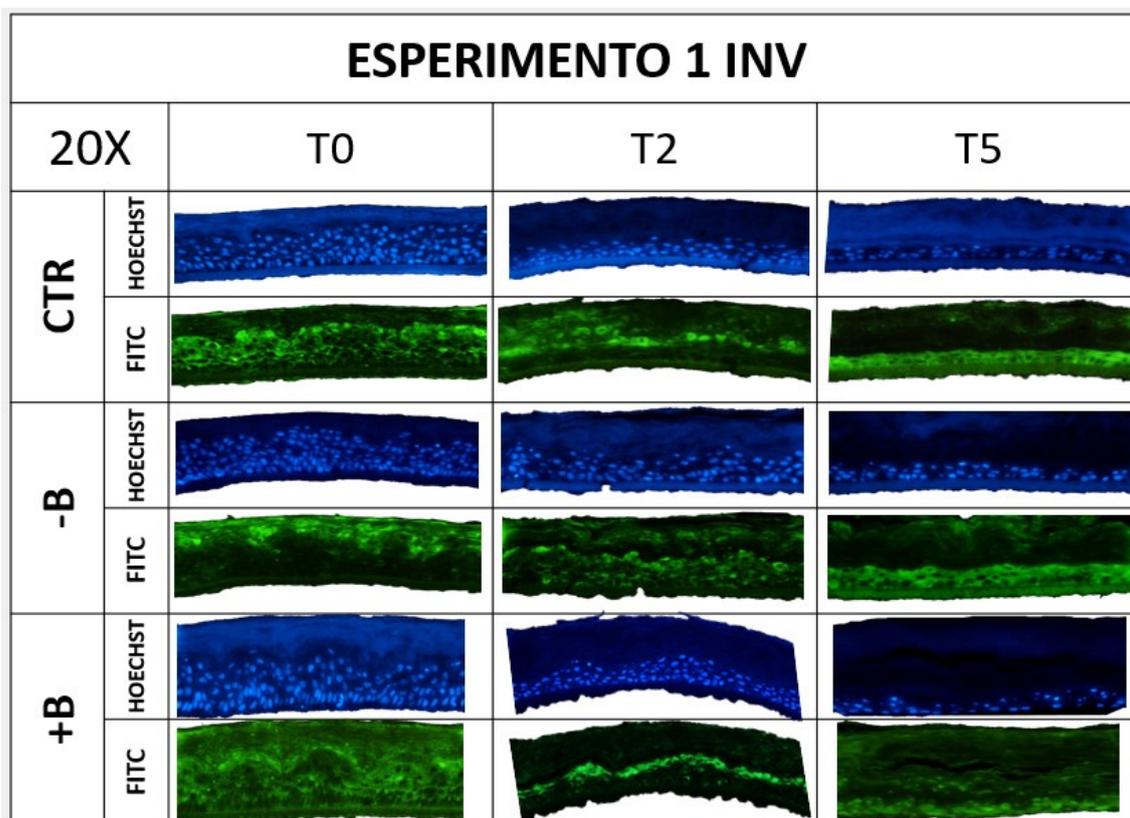


Fig.20 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione delle involucrine (INV) dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 (esperimento 1). Le involucrine sono marcate con anticorpo FITC coniugato (fluorescenza verde), i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Nell'esperimento 1, il **T0 CTR** presenta una marcatura diffusa in tutti gli strati sovrabasali, con un'intensità maggiore osservata nello strato granuloso. Diversamente, il **T2 CTR** presenta una marcatura a livello dello strato granuloso e degli strati cheratinizzati sovrastanti. Il **T5 CTR** presenta una marcatura diffusa in tutti gli strati cellulari, con una intensità di fluorescenza omogenea, analoga in tutti gli strati. Il **T0 BPA** presenta una marcatura analoga al campione T0 CTR, infatti, presenta una marcatura diffusa in tutta la componente cellulare con una maggiore intensità nello strato granuloso. Nel campione **T2 BPA**, è possibile osservare una marcatura uniforme a livello dello strato spinoso e granuloso, con la medesima intensità di fluorescenza in entrambi gli strati cellulari. Inoltre, in comparazione con il T2 CTR, presenta una maggiore intensità di fluorescenza. Il **T5 BPA** presenta una distribuzione e un'intensità di marcatura analoga al campione T5 CTR. Il **T0 senza BPA**, in comparazione con il T0

CTR, presenta una differente localizzazione della marcatura, osservata nelle file di cellule dello strato granuloso maggiormente a contatto con lo strato corneo. Diversamente, il **T2 senza BPA** presenta una marcatura localizzata in tutti gli strati sovrabasali della componente cellulare, con un'intensità maggiore osservata nello strato granuloso. Il **T5 senza BPA**, così come osservato nel campione T5 CTR, presenta una marcatura diffusa in tutti gli strati intermedi, con una stessa intensità di fluorescenza.

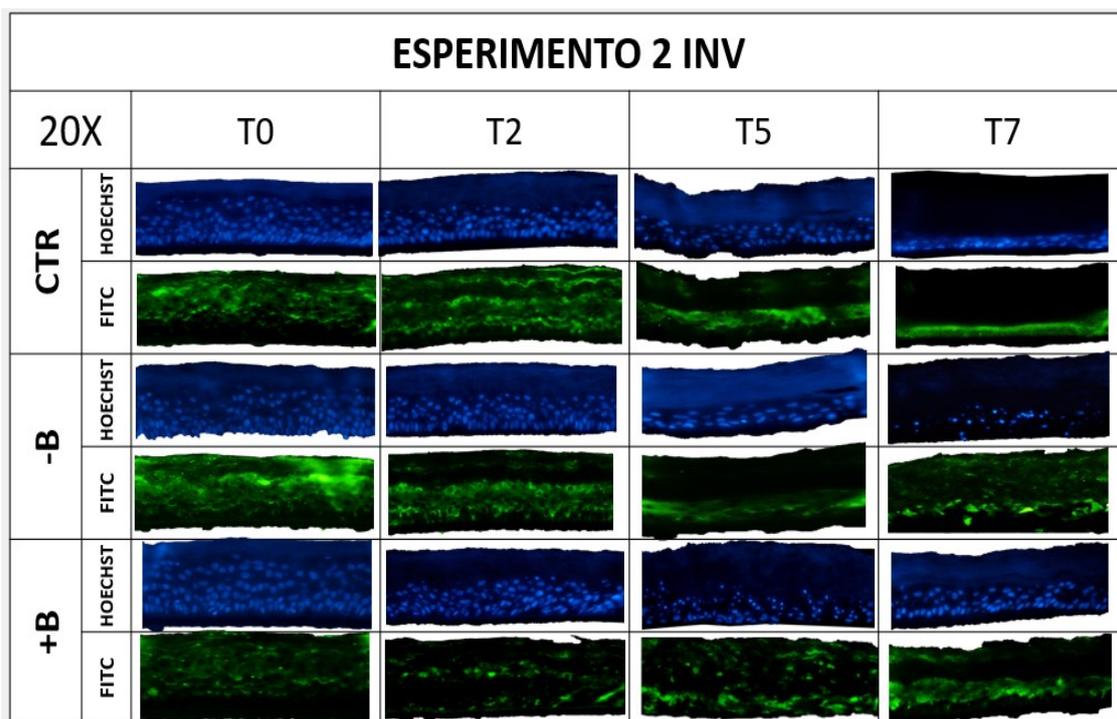


Fig.21 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione delle involucrine (INV) dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 e T7 (esperimento 2). Le involucrine sono marcate con anticorpo FITC coniugato (fluorescenza verde), i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Nell'esperimento 2, il **T0 CTR** presenta marcatura diffusa negli strati intermedi, con una maggiore intensità di fluorescenza osservata nello strato spinoso. Nel campione **T2 CTR**, è possibile osservare una marcatura diffusa in tutta la componente cellulare, con una maggiore intensità di fluorescenza rilevata negli strati inferiori dello spinoso e negli strati cellulari del granuloso maggiormente a contatto con lo strato cheratinizzato. Il **T5 CTR**, presenta una marcatura uniforme a livello dello strato spinoso

e granuloso, con la medesima intensità di fluorescenza in entrambi gli strati cellulari. Il **T7 CTR** presenta una marcatura diffusa in tutta la componente cellulare. Allo stesso tempo, è possibile osservare una componente epidermica quasi completamente cheratinizzata, per tale motivo risulta difficile localizzare ed apprezzare con precisione una marcatura. Il campione **T0 BPA**, in comparazione con il T0 CTR, presenta una distribuzione e una localizzazione di marcatura analoga, ma una minore intensità di fluorescenza. Nel campione **T2 BPA**, è possibile osservare una marcatura localizzata unicamente e in modo poco omogeneo nello strato granuloso. Il **T5 BPA**, diversamente dal T5 CTR, presenta una marcatura con distribuzione uniforme in tutto lo strato spinoso e una marcatura poco evidente a livello dello strato granuloso. Il **T7 BPA** presenta una marcatura uniforme a livello dello strato spinoso e granuloso, con la medesima intensità di fluorescenza in entrambi gli strati cellulari. I campioni **T0, T2, T5** e **T7** non trattati (**senza BPA**) presentano delle analogie con i campioni CTR corrispondenti alla stessa cinetica di taglio, in termini di localizzazione, intensità e distribuzione di marcatura.

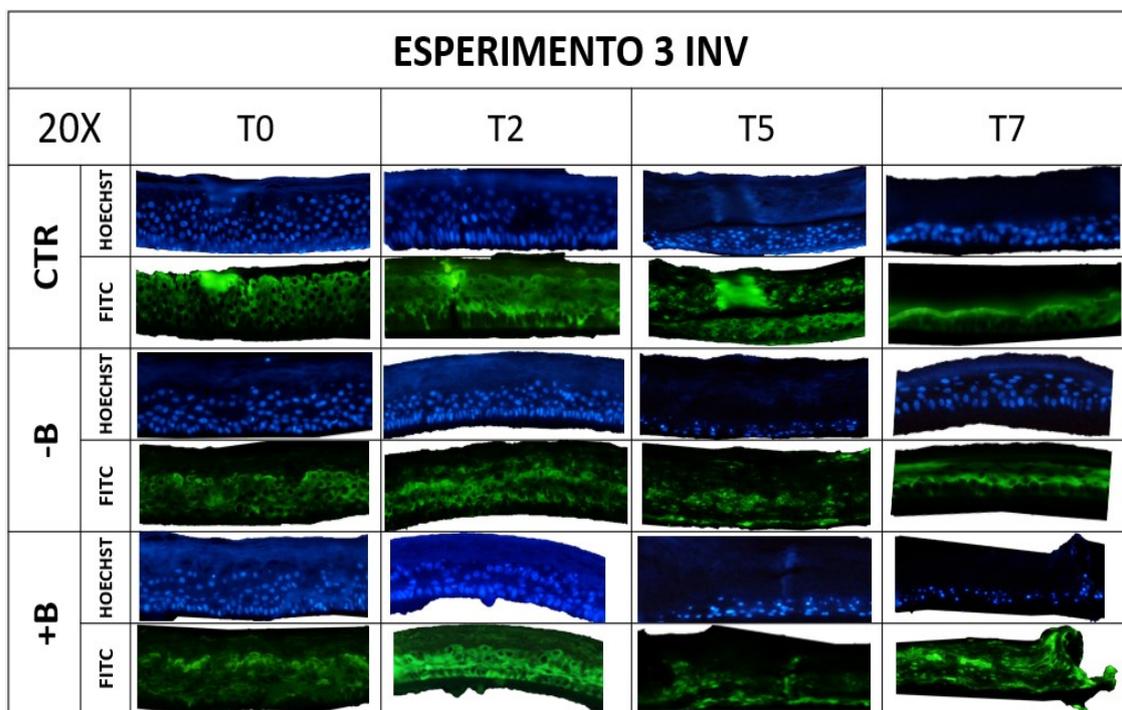


Fig.22 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione delle involucrine dei campioni RHE: controllo, con boro e privi di boro ai tempi: T0, T2, T5 e T7 (esperimento 2). Le involucrine sono marcate con anticorpo FITC coniugato (fluorescenza verde), i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Nell'esperimento 3, i campioni **T0 CTR** e **T5 CTR** presentano una marcatura localizzata in tutti gli strati sovrabasali, con una stessa intensità di fluorescenza. Diversamente, il **T2 CTR** e il **T7 CTR** presentano una marcatura distribuita in tutti gli strati sovrabasali ma con diversa intensità di fluorescenza espressa negli strati intermedi. Il **T2 CTR** presenta una intensità di fluorescenza maggiore nello strato spinoso rispetto i restanti strati cellulari, così come il **T7 CTR** presenta una maggior intensità di fluorescenza a livello dello strato granuloso. Il **T0 BPA**, in comparazione con il **T0 CTR**, presenta una distribuzione e una localizzazione di marcatura analoga ma con un grado di intensità, in termini di fluorescenza, maggiore negli strati più superficiali del granuloso. Il **T2 BPA** presenta una marcatura uniforme a livello dello strato spinoso e granuloso, con la medesima intensità di fluorescenza in entrambi gli strati cellulari. Il **T5 BPA**, in comparazione con il **T5 CTR**, presenta una marcatura analoga in termini di intensità e localizzazione. Nel campione **T7 BPA** è possibile osservare uno spessore epidermico quasi completamente cheratinizzato, questo determina una difficoltà nell'osservare con precisione la localizzazione e la presenza di marcatura a livello della componente cellulare. Il **T0 senza BPA**, in comparazione con il **T0 CTR**, presenta un'analoga distribuzione e localizzazione di marcatura, ma con una lieve intensità di fluorescenza maggiore nello strato granuloso. Il **T2 senza BPA**, diversamente dal **T2 CTR**, presenta una marcatura uniforme a livello dello strato spinoso e granuloso, con la medesima intensità di fluorescenza in entrambi gli strati cellulari. Il **T5 senza BPA** presenta una marcatura diffusa in modo omogenea in tutta la componente cellulare. Da ricordare, però, così come riportato per il campione **T7 BPA**, la difficoltà di osservare una marcatura ben definita a causa di una componente cellulare poco rappresentata. Il **T7 senza BPA**, in comparazione con il **T7 CTR**, presenta una analoga marcatura in termini di localizzazione, ma con una maggiore intensità di fluorescenza osservata nello strato spinoso rispetto i restanti strati cellulari.

5.2.1 Analisi morfo-istologiche dei campioni RHE controllo al tempo T7

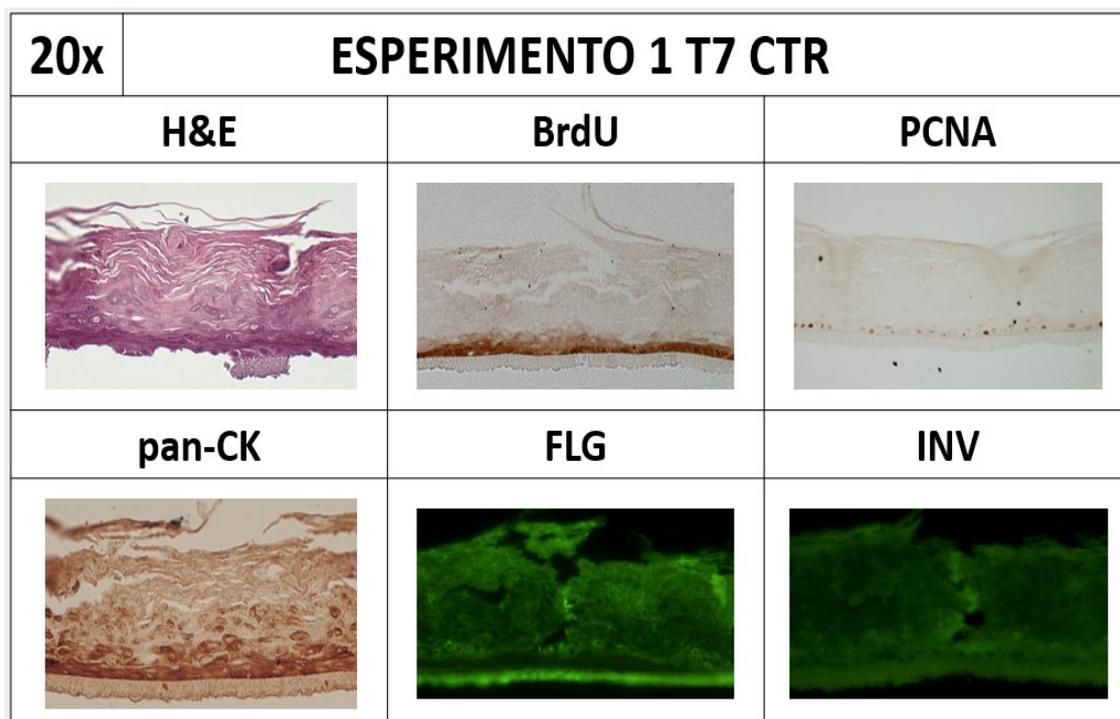


Fig.23 Campioni RHE controllo (CTR) al tempo T7(esperimento 1): colorazione con ematossilina-eosina (E&E). Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione delle involucrine e delle filaggrine.) Immagini in luce trasmessa di immunomarcatura anti-pancitocheratine (pan-CK), anti-PCNA, anti-BrdU (ingr. ob. 20X). La colorazione marrone è prodotta dalla reazione sviluppata con il cromogeno DAB.

Una particolare attenzione, nell'esperimento 1, è stata rivolta all'analisi morfo-istologica dei campioni RHE controllo (non irraggiati) al tempo T7. Il campione controllo al tempo T7 è stato sottoposto alla colorazione ematossilina-eosina prima di essere osservato e analizzato morfologicamente al microscopio ottico. Il campione T7 CTR ha mostrato una componente cellulare formata da poche cellule sparse e ovoidali, con la completa perdita del tipico aspetto morfologico epidermico e la perdita dell'integrità del costrutto, con il distacco del supporto.

Successivamente all'analisi morfologica, è stata applicata l'immunostochimica per la valutazione dell'istoarchitettura dei campioni controllo (non irraggiati) al tempo T7. In particolare, dall'analisi del saggio immunostochimico per la rivelazione delle filaggrine

e delle involucrine, avvenuta mediante l'osservazione con ingrandimento al 20X al microscopio a fluorescenza, è stato possibile osservare una totale assenza di marcatura.

Infine, dalla mia collega Stefania Ricci, come descritto nel capitolo 2, sono state condotte delle analisi relative alla valutazione dell'aspetto proliferativo dei campioni RHE. In particolare, è stata applicata l'immunoistochimica per le rilevazioni di *markers* di proliferazione e riparazione cellulare.

Nell'esperimento 1 è stato effettuato, sul campione controllo al tempo T7, il saggio di incorporazione della Bromodesossiuridina, *Bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) che consente il rilevamento delle cellule proliferanti presenti nei campioni biologici. Dall'analisi del saggio, è stato possibile osservare un'assenza di marcatura, associata ad una difficoltà dell'analisi stessa a causa della perdita del tipico aspetto morfologico epidermico. Un risultato analogo è stato osservato in seguito al saggio immunoistochimico per la rivelazione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA).

5.3 Analisi dei costrutti RHE irraggiati con fotoni

SkinEthic™ RHE è stato selezionato come il modello cutaneo più idoneo per studiare gli effetti della terapia di cattura neutronica nel boro (BNCT) a livello cutaneo. Oltre agli esperimenti precedentemente descritti, identiche valutazioni sono state effettuate anche su campioni di SkinEthic™ RHE irraggiati con fotoni. Ciascun campione, è stata valutato a 4 differenti tempi dall'irraggiamento: **T0, T2, T5, T7**. Per ogni tempo, è stato analizzato il campione controllo e cinque differenti campioni, ciascuno irraggiato con dosi crescenti di fotoni differente come precedentemente descritto nel paragrafo 4.3.

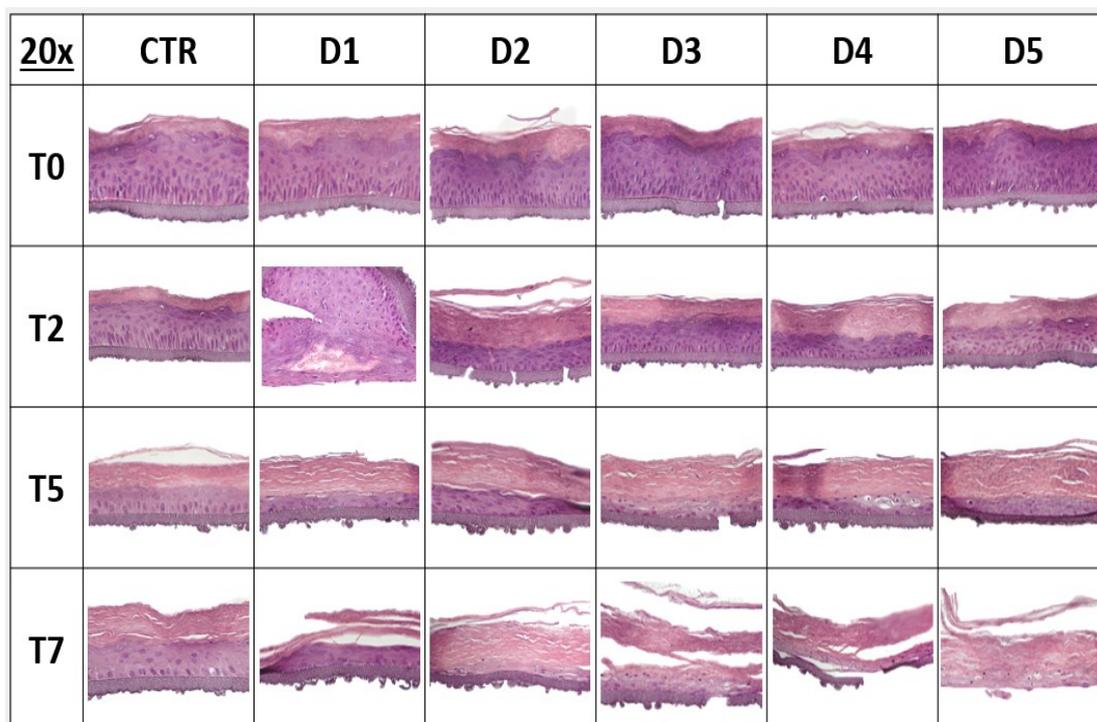


Fig. 24 Campioni RHE colorati con ematossilina-eosina: controllo (CTR), irraggiati con fotoni a 5 dosi e crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi: T0, T2, T5 e T7. (ingr. ob. 20X).

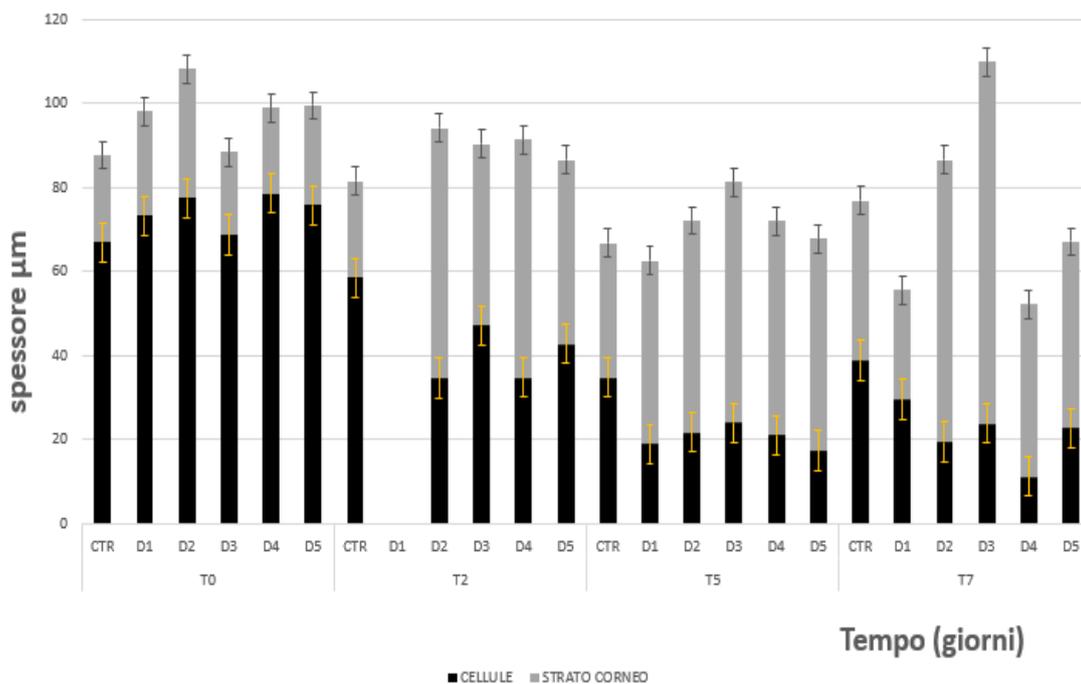


fig.25 Grafico relativo alla colorazione ematossilina-eosina dei campioni RHE, In ordinata la misura degli spessori dello strato cellulare e dello strato corneo (in μm), relativi ai costrutti RHE di controllo (CTR) e irraggiati con fotoni a 5 dosi differenti e crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi espressi in giorni (T0, T2, T5, T7), riportati sull'asse delle ascisse.

Dall'analisi delle sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina dei campioni irraggiati alle diverse dosi, rispetto a quelli di controllo, è possibile osservare: al tempo T0, una morfologia invariata; al tempo T2, una diminuzione dello spessore cellulare ed un corrispettivo aumento dello strato corneo, indipendentemente dalla dose ricevuta; al tempo T5, una progressiva alterazione della componente cellulare dei campioni all'aumentare della dose di irraggiamento, sino alla perdita completa riscontrata nel campione esposto alla dose superiore; al tempo T7, una perdita totale della componente cellulare, la degradazione dell'intero spessore epidermico, con strati cheratinizzati non più compatti, ed, alla dose superiore di trattamento, il distacco del filtro di policarbonato.

La rivelazione immunohistochimica delle pancitocheratine è stata effettuata con il cromogeno DAB che sviluppa una colorazione marrone. L'osservazione microscopica è stata effettuata al microscopio ottico con un ingrandimento a 20X. Il campione T2 D1 non è stato studiato per carenza di materiale.

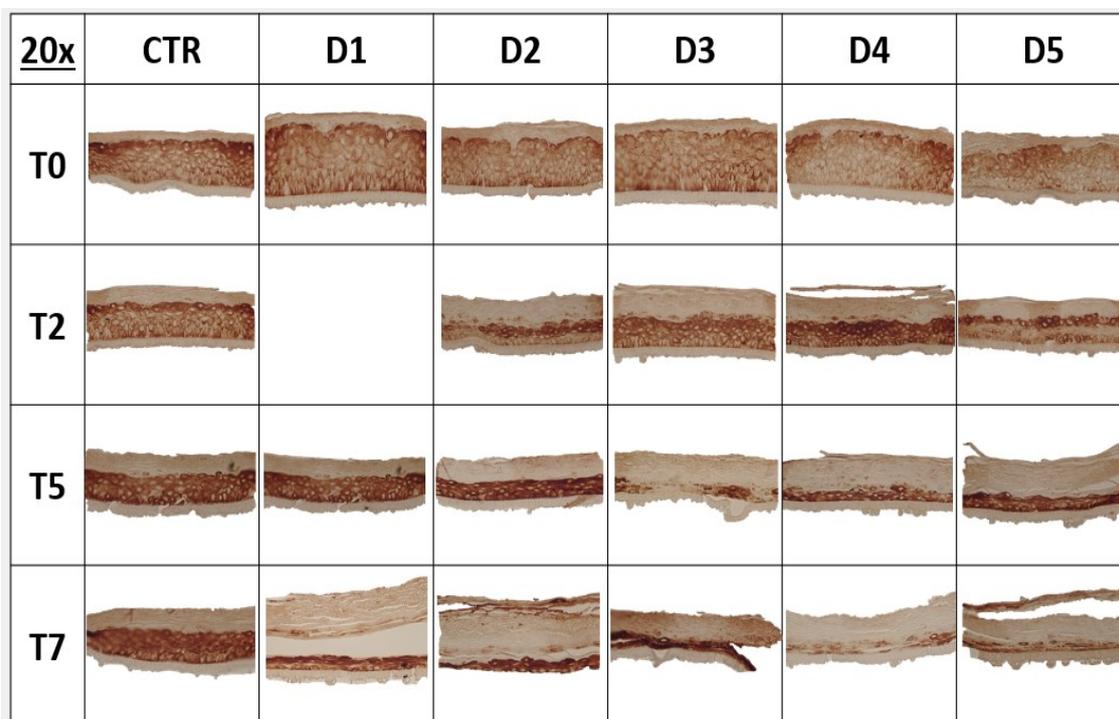


Fig. 26 Immagini in luce trasmessa (ingr. ob. 20X) dopo saggio immunohistochimico (IHC) per la rivelazione delle pan-citocheratine dei campioni RHE: controllo e irraggiati con fotoni a 5 dosi differenti e crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi: T0, T2, T5 e T7. La colorazione marrone è prodotta dalla reazione sviluppata con il cromogeno DAB.

In tutti i campioni, è possibile apprezzare in tutti gli strati cellulari una marcatura diffusa ed omogenea, ad eccezione dei campioni T7 D4 e D5, dove l'assenza di marcatura è associabile alla quasi totale perdita degli strati cellulari.

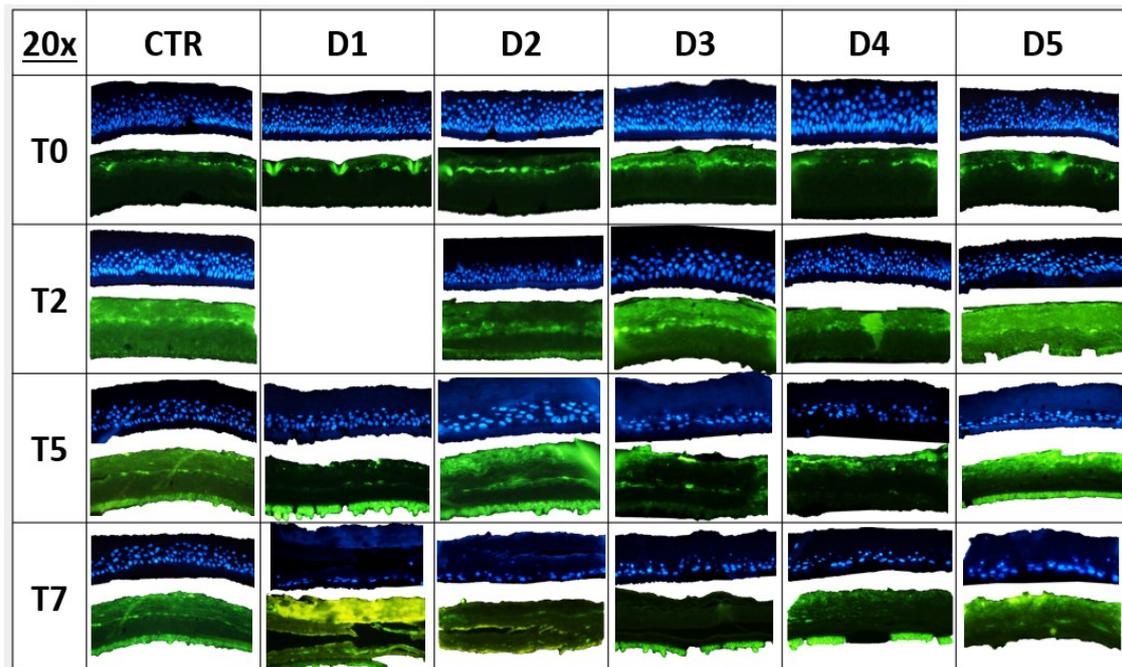


Fig.27 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunostochimico (IHC) per la rivelazione delle filaggrine dei campioni RHE: controllo e irraggiati con fotoni a 5 dosi differenti e crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi: T0, T2, T5 e T7. Le filaggrine sono marcate con anticorpo FITC coniugato (fluorescenza verde), i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Dall' analisi dei campioni in cui è stato effettuato il saggio immunostochimico per la rivelazione delle filaggrine, è possibile apprezzare in tutti i campioni T0 una marcatura ben evidente, in termini di fluorescenza, nella porzione di strato granuloso più a ridosso dello strato corneo. Nei campioni T2 D2 e D3, in comparazione con il campione T2 CTR, è possibile osservare una marcatura analoga per intensità e localizzazione. Diversamente, nei campioni T2 D4 e T2 D5 è possibile osservare una marcatura di minore intensità. I campioni T5 CTR e T7 CTR presentano una marcatura distribuita in maniera omogenea nello strato granuloso, ma di minor intensità se confrontati con i campioni T0 CTR e T2 CTR. Nei campioni T5 D1, T5 D2 e T5 D3, è possibile osservare un'assenza, quasi totale, di marcatura. I campioni T5 D3, T5 D4 e tutti i campioni T7 sono completamente privi di marcatura.

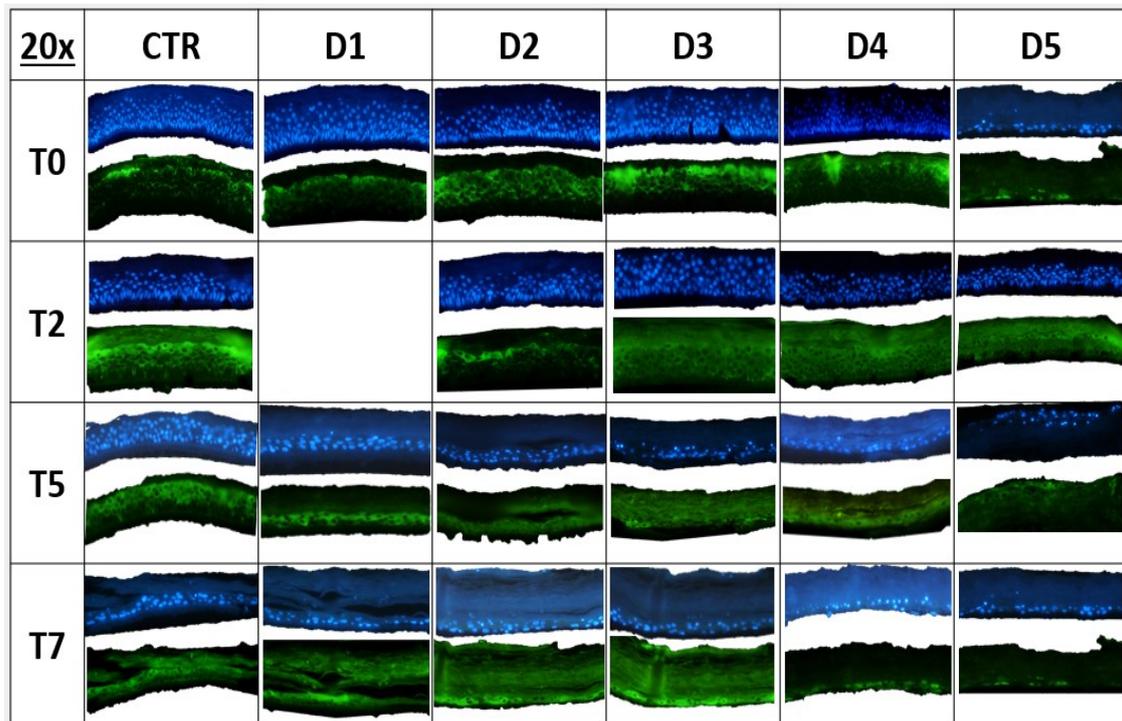


Fig.28 Immagini in fluorescenza (microscopio in fluorescenza Zeiss Axiophot, ingr. ob. 20x) dopo saggio immunocitochimico (IHC) per la rivelazione delle involucrine dei campioni RHE: controllo e irraggiati con fotoni a 5 dosi differenti e crescenti (D1,D2,D3,D4,D5) ai tempi: T0, T2, T5 e T7. Le involucrine sono marcate con anticorpo FITC coniugato (fluorescenza verde), i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

Dall' analisi del saggio immunocitochimico per la rivelazione delle involucrine, nel campione T0 CTR è possibile apprezzare una marcatura diffusa in tutti gli strati sovrabasali, con una maggiore intensità osservata nello strato granuloso. In tutti i campioni T0, ad eccezione del T0 D5 in cui è difficile valutare una marcatura a causa dell'assenza della componente cellulare, è possibile osservare una marcatura diffusa in maniera omogenea negli strati intermedi. Il campione T2 CTR presenta una marcatura ben evidente negli strati intermedi, con un'intensità di fluorescenza concentrata maggiormente nello strato granuloso. Nel campione T2 D2 è possibile osservare una marcatura analoga al T2 CTR. Nei campioni T2 D3, T2 D4 e T2 D5 è possibile osservare una marcatura poco evidente nella componente cellulare. I campioni T5 CTR e T5 D1 presentano una marcatura diffusa negli strati intermedi. Nei restanti campioni T5, la marcatura è quasi completamente assente. Tutti i campioni T7

presentano una componente cellulare costituita da una singola fila di cellule, questo determina l'impossibilità di apprezzare una marcatura.

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La Terapia per Cattura Neutronica nel Boro (BNCT) è una radioterapia innovativa con ampie potenzialità nell'ambito oncologico, volta a danneggiare in modo mirato e specifico le cellule tumorali salvaguardando i tessuti sani adiacenti al tumore. Il principio di questa radioterapia innovativa si basa sulla veicolazione e penetrazione selettiva del composto borato ^{10}B all'interno delle cellule tumorali, a cui segue l'irradiazione del tumore solido con neutroni termici. Uno degli aspetti necessari da valutare, prima dell'applicazione sperimentale della BNCT, sono i potenziali effetti avversi provocati dalle radiazioni sui tessuti sani, in particolare a livello cutaneo, la cui sensibilità alla radiazione costituisce un fattore limitante a livello di radiazioni utilizzabile nel trattamento del tumore. Per queste ragioni, nel seguente progetto di tesi, è stato selezionato l'equivalente epidermico SkinEthic™ RHE come modello cutaneo, per valutare gli effetti indotti da BNCT. Si tratta di un modello *in vitro* tridimensionale di epidermide ricostruita da cheratinociti umani derivati da donatori diversi che presenta un'elevata somiglianza morfologica e isto-architeturale con l'epidermide umana. In tutti gli esperimenti, il costrutto SkinEthic™ è stato sottoposto a due condizioni di irraggiamento rispetto ad una condizione di controllo non irraggiato, ottenendo tre tipologie di campioni: controllo (CTR), irraggiato senza BPA, irraggiato con BPA. Ciascun campione è stato valutato a 3 differenti tempi di osservazione nell'esperimento 1 (T0, T2, T5) e a 4 differenti tempi negli esperimenti 2 e 3 (T0, T2, T5, T7). Inoltre, come riportato nel paragrafo 4.3, sono state calcolate le dosi di radiazioni assorbite dai campioni irraggiati, diverse nei vari esperimenti.

Il primo obiettivo dei tre esperimenti effettuati è stato rivolto all'analisi morfologica dei costrutti RHE. Dall'analisi dei dati ottenuti, dopo la colorazione dei campioni con ematossilina eosina, è emerso un andamento comune a tutti gli esperimenti, indipendentemente dalla diversa concentrazione di boro e quindi di dose di radiazione assorbita, ovvero una compromissione dell'integrità del costrutto RHE dopo 7 giorni di mantenimento in coltura. Tutti i campioni controllo (non irraggiati) al tempo T7, come descritto nel paragrafo 5.2.1, sono stati sottoposti a diverse analisi per le valutazioni morfo-istologiche e relative all'espressione di *markers* di proliferazione e riparazione cellulare. Dall'osservazione dei dati ottenuti è stato possibile definire un *end-point*

temporale, fissato al 7 giorno di mantenimento in coltura dei campioni, oltre il quale non è possibile ottenere un'affidabilità del costrutto RHE. Pertanto, questi risultati hanno permesso di comprendere che già la sola variabile tempo, unico fattore che interviene nei campioni controllo, influenza la stabilità e l'integrità del costrutto.

Nell' **esperimento 1**, dall'analisi morfologica eseguita, è possibile osservare i primi effetti dell'irraggiamento neutronico in assenza ed in presenza di boro, ovvero spazi vuoti otticamente visibili nello strato basale dei campioni T0. Inoltre, in tutti i campioni, indipendentemente dall'irraggiamento, si osserva un cambiamento morfologico progressivo dell'epidermide sino alla completa perdita della struttura istologica, non più comparabile con l'epidermide umana al tempo T5. Quest'analisi è avvalorata ulteriormente dal grafico relativo agli spessori cellulari, dal quale si evince che tutti i campioni, compresi i campioni controllo, subiscono una progressiva riduzione dello spessore cellulare nel tempo. Confrontando i campioni irraggiati con i rispettivi campioni controllo e considerando la variabilità biologica di ciascun campione, si può desumere che i costrutti irraggiati con boro non hanno subito un danno maggiore rispetto ai campioni irraggiati con soli neutroni.

Nell'esperimento 2, ciascun campione irraggiato senza boro ha preservato un aspetto morfologico analogo al corrispondente campione controllo, indice del fatto che l'irraggiamento esclusivamente con neutroni non ha determinato particolari alterazioni morfologiche. Probabilmente a causa della variabilità biologica dei campioni stessi utilizzati per questo set sperimentale, al tempo T5 sia il campione controllo che quello senza boro presentano una degenerazione cellulare. Diversamente, i campioni trattati con boro hanno manifestato danni di intensità crescente nel tempo, con una lieve degenerazione degli strati intermedi nel campione T0, la presenza di cellule apoptotiche nel campione T5 e completa perdita degli strati cellulari nel campione T7. In questo esperimento è stata quindi osservata un'alterazione morfologica più spiccata nei campioni trattati con boro rispetto a quella dei campioni irraggiati in assenza di boro.

Le osservazioni morfologiche dei costrutti RHE relative all'**esperimento 3**, non hanno mostrato cambiamenti morfologici nei campioni irraggiati senza boro, ma tutti i campioni trattati con boro, eccetto il campione T0, hanno manifestato una completa degenerazione dello spessore epidermico, come probabile effetto avverso del trattamento.

Sempre con l'obiettivo di valutare eventuali alterazioni nell'istoarchitettura dei campioni SkinEthic™ RHE sottoposti ad irraggiamento, sono state effettuate analisi immunohistochimiche per studiare l'espressione e la localizzazione di proteine tipiche della fase di differenziazione terminale epiteliale. In particolare, sono state considerate la filaggrina, l'involucrina e le pancitocheratine, espresse fisiologicamente nell'epidermide nella fase che precede il processo di cheratinizzazione.

I risultati ottenuti dal saggio immunohistochimico per la rivelazione delle citocheratine, applicato in tutti gli esperimenti, hanno mostrato che il processo di espressione di queste proteine durante la fase di differenziamento terminale dei cheratinociti sembra non essere stato alterato da nessuna delle modalità di irraggiamento adottate.

Dal saggio immunohistochimico per la rivelazione delle filaggrine nell'**esperimento 1**, sia nei campioni controllo sia nei campioni irraggiati è possibile osservare una progressiva diminuzione di espressione proteica nel tempo, sino alla completa assenza dopo 5 giorni di mantenimento in coltura. Nell'**esperimento 2** è possibile osservare una condizione analoga, con una differenza associata alla perdita di espressione di filaggrina evidenziata solo dopo 7 giorni di mantenimento in coltura. Questo *trend* è riscontrato all'interno di ciascun gruppo (controllo ed irraggiato senza e con boro) e probabilmente anche in questo caso è riconducibile alla variabilità biologica del costrutto stesso. Nell'**esperimento 3**, dal saggio immunohistochimico, è possibile osservare un'espressione della filaggrina nello strato granuloso di tutti i campioni controllo e dei campioni irraggiati al tempo T0. Diversamente, nei restanti campioni irraggiati con boro, è possibile osservare l'espressione di filaggrina solamente nello strato cheratinizzato. Nei campioni irraggiati senza boro è possibile rilevare una bassa espressione della proteina d'interesse.

Dall'analisi dei dati ottenuti, è possibile affermare che l'irraggiamento ha provocato dei danni nell'istoarchitettura dei campioni RHE, alterando il processo di

differenziamento dei cheratinociti dello strato granuloso, con danni di maggiore entità determinati dall'irraggiamento in presenza di boro.

Per completare l'analisi dell'espressione e localizzazione di proteine tipiche della fase di differenziazione terminale epiteliale dei costrutti RHE irraggiati, è stato effettuato un saggio immunostochimico per la rivelazione delle involucrine. Nell'**esperimento 1**, dall'analisi dei dati ottenuti, è stato possibile evidenziare un'espressione dell'involucrina localizzata negli strati intermedi di tutti i campioni RHE, fatta eccezione per il campione T0 senza boro risultato privo di marcatura. Inoltre, il campione T2 con boro ha evidenziato una maggiore espressione dell'involucrina rispetto al T2 CTR, con una localizzazione ben definita nello strato granuloso. Si ipotizza che la dose di radiazione assorbita dal costrutto in seguito al trattamento BNCT abbia stimolato la produzione di involucrine, successivamente reclutate nel processo di formazione dell'involucro corneificato che ha poi determinato l'ispessimento dello strato corneo essenziale per una maggiore protezione degli strati cellulari. Nell'**esperimento 2**, i campioni irraggiati senza boro, non hanno presentato particolari differenze rispetto ai campioni controllo. Diversamente, il campione T2 con boro, in comparazione con il rispettivo controllo, ha evidenziato un'espressione delle involucrine prevalentemente concentrate nello strato granuloso. Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che l'irraggiamento senza boro non ha determinato particolari alterazioni dell'espressione dell'involucrina, mentre l'irraggiamento con boro ha determinato una maggiore sollecitazione del processo di differenziamento terminale dei cheratinociti dello strato granuloso del campione mantenuto in coltura per due giorni. Nell'**esperimento 3**, non sono state osservate delle significative differenze, in termini di espressione e localizzazione di marcatura, tra i campioni irraggiati e i campioni controllo; pertanto, è possibile concludere che l'irraggiamento non ha determinato un'alterazione nel processo di differenziamento terminale epidermico dei campioni RHE.

Ulteriori analisi sono state condotte sul costrutto SkinEthic™. Come riportato nel paragrafo 5.3, è stata analizzata la morfologia e l'isto-architettura dei costrutti sottoposti a radiazione con fotoni.

Dall'analisi morfologica, eseguita dopo la colorazione ematossilina eosina, è possibile affermare che, la perdita progressiva della morfologia cellulare e dell'architettura tissutale dei campioni controllo, in funzione del progressivo trascorrere dei giorni in coltura del costrutto, risulta confermare le aspettative e rappresenta un'ulteriore conferma dell'influenza della variabile tempo sull'integrità del costrutto.

Ai tempi T0 e T2, è possibile osservare una morfologia delle cellule tipiche dei differenti strati in tutti i campioni, anche nei costrutti sottoposti a dosi maggiori di radiazione.

Nei campioni mantenuti in coltura per 5 giorni in seguito all'irraggiamento, è possibile osservare una progressiva alterazione della componente cellulare all'aumentare della dose di irraggiamento, sino alla perdita completa riscontrata nel campione esposto alla dose D5.

L'osservazione dei campioni a sette giorni ha consentito di apprezzare un maggior effetto degradativo, anche a dosi non elevate. L'effetto combinato di tempo e radiazione determina la completa degradazione del costrutto.

Da questa serie di osservazioni morfologiche, è possibile affermare che, diversamente dai campioni irraggiati con BNCT sui quali risulta difficile associare le alterazioni istologiche alla dose di radiazioni assorbita, i costrutti irraggiati con fotoni subiscono un'alterazione morfologica e istoarchiteturale lineare nel tempo e proporzionale alla dose di radiazione assorbita.

Dall'analisi dei risultati, ottenuti dal saggio immunostochimico per la rivelazione delle citocheratine, è possibile osservare un'elevata espressione delle proteine in tutti i campioni, indipendentemente dalla dose ricevuta, fatta eccezione per i campioni irraggiati con alte dosi e mantenuti in coltura fino al settimo giorno. I dati appena discussi mettono in luce una condizione particolare, ovvero un mantenimento dell'espressione delle citocheratine nel costrutto RHE costante nel tempo e indipendente dalla tipologia di radiazione ricevuta.

Inoltre, dalle analisi del saggio immunostochimico per la rivelazione delle filaggrine, è possibile evidenziare un'espressione costante della proteina in tutti i campioni al tempo T0. Ai tempi T2 e T5, è possibile osservare una progressiva perdita di marcatura all'aumentare della dose ricevuta. In tutti i campioni T7, è possibile osservare una mancata espressione della filaggrina.

Infine, dall'analisi del saggio immunostochimico per la rivelazione delle involucrine, sono emersi risultati analoghi al precedente saggio.

In conclusione, i risultati ottenuti nel mio progetto di tesi evidenziano il trattamento BNCT su sezioni del costrutto SkinEthic™ RHE ha determinato effetti biologici caratterizzati da un'alterazione della tipica morfologia cellulare epidermica e una degradazione della componente isto-architetturale provocata da una espressione irregolare delle proteine rilasciate dai cheratinociti nel processo di differenziamento terminale, come le filaggrine e le involucrine. Non è stata riscontrata una significativa riduzione e alterazione dell'espressione di citocheratine. Inoltre, l'entità delle alterazioni riscontrate nei campioni irraggiati con boro è superiore a quella dei campioni irraggiati senza boro. Gli effetti indotti dalla BNCT non sono stati riscontrati omogeneamente in tutti i campioni, non sono dipendenti dal tempo di mantenimento in coltura del costrutto e non sono correlabili ad una dose-soglia di radiazione assorbita. Da queste considerazioni, emerge la difficoltà di desumere un valore minimo di dose assorbita a cui possa essere associato il manifestarsi di un danno biologico a carico dell'epidermide. Un fattore critico, emerso dall'analisi dei dati acquisiti in questo progetto di tesi, è l'estrema variabilità del costrutto SkinEthic™ RHE, limite che può essere in parte superato incrementando la numerosità degli esperimenti al fine di standardizzare i risultati. Diversamente, dall'analisi dei costrutti sottoposti a radiazione con fotoni, si evince che l'alterazione e la degradazione morfo-istologica segue un andamento più lineare nel tempo e proporzionale alla dose di radiazione ricevuta.

In parallelo, presso l'Unità di Istologia ed Embriologia Generale del Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense dell'Università degli Studi di Pavia, è stato svolto uno studio comparativo tra campioni irraggiati e il gruppo dei campioni controllo, con l'obiettivo di analizzare gli effetti biologici associati all'espressione di *markers* di proliferazione e riparazione cellulare.

Studi futuri saranno pianificati per approfondire alcuni aspetti emersi dalle analisi morfologiche ed immunostochimiche, con l'obiettivo di apportare un contributo al più ampio progetto di ricerca su BNCT in cui è inserito questo lavoro di tesi. Tra questi aspetti, sarà necessario quantificare, in termini d'intensità di fluorescenza, le marcature apprezzate mediante osservazione al microscopio dopo l'applicazione del

saggio immunocistochimico. Inoltre, sarà molto importante condurre l'analisi biochimica delle proteine tipiche del processo di differenziamento terminale dei cheratinociti e valutare l'espressione delle proteine che costituiscono le *tight junctions* (TJs) o giunzioni strette, come le claudine che interagiscono con le giunzioni occludenti ZO (*zonula occludens*) per il mantenimento dell'integrità e della polarità dell'epidermide. Negli studi successivi, bisognerà condurre le analisi precedentemente citate su sezioni di SkinEthic™ ad una cinetica temporale antecedente al quinto giorno di osservazione, in modo tale da ridurre l'influenza della variabile tempo sulla stabilità ed integrità del costrutto; optando per una osservazione dei campioni irraggiati ai tempi T0, T1, T2, T3. Infine, sarà necessario ottenere una maggiore quantità di dati biologici statisticamente significativi tale da consentire lo sviluppo di un modello dosimetrico da utilizzare per esprimere la dose di radiazione neutronica fotone-equivalente.

7 BIBLIOGRAFIA

- Alépée N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M., Doucet O., Pachot J., Méloni M., de Brugerolle de Fraissinette A.** (2010) "A Catch-up Validation Study on Reconstructed Human Epidermis (SkinEthic™ RHE) for Full Replacement of the Draize Skin Irritation Test". *Toxicology in Vitro* 24 (1): 257–266.
- Ambrosi G., Castano P., Donato.R.F.** (2004). *Anatomia dell'uomo. Edi-Ermes. Parte seconda. Capitolo 17. Pag 429-436.* s.d.
- Archambeau J. O.** (1970). "The Effect of Increasing Exposures of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ Reaction on the Skin of Man". *Radiology*, 94(1), 179–187.
- Aragona M., Alejandro S., Milan M., Yura., Jens V., Sophie D., Souhir G.,** (2020). "Mechanisms of Stretch-Mediated Skin Expansion at Single-Cell Resolution". *Nature* 584 (7820): 268–273.
- Ballarini F., Bakeine J.G., Bortolussi S., Bruschi P., Clerici A.M., De Bari A., Dionigi P., Ferrari C., Gadan M.A., Protti N., Stella S., Zonta C., Zonta A., Altieri S.** (2010) "Nuclear Physics meets Medicine and Biology: Boron Neutron Capture Therapy". *CERN-Proceedings Vol.2* : 561-571.
- Bakhshandeh B., Payam Z., Mohammad O., Farid., Hamideh F., Salma S., Zarrintaj Z.** (2017). "Tissue Engineering; Strategies, Tissues, and Biomaterials". *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 33 (2): 144–172.
- Barth, R. F., Jeffrey A. C., Graça H. V., Thomas E. B.** (2005). "Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects". *Clinical Cancer Research* 11 (11): 3987–4002.
- Barth, R. F., Peng M., Weilian Y.** (2018). "Boron Delivery Agents for Neutron Capture Therapy of Cancer". *Cancer Communications* 38 (1): 35.
- Bäsler K., Sophia B., Michael H., Arne N., Zorn-Kruppa M., Brandner M.J.** (2016). "The Role of Tight Junctions in Skin Barrier Function and Dermal Absorption". *Journal of Controlled Release* 242 (novembre): 105–118.
- Bäsler K., Brandner M.J.** (2017). "Tight Junctions in Skin Inflammation". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 469 (1): 3–14.
- Baumann L.** (2007). "Skin Ageing and Its Treatment". *The Journal of Pathology* 211 (2): 241–251.
- Bernerd F., Asselineau D.** (1998). "UVA Exposure of Human Skin Reconstructed in Vitro Induces Apoptosis of Dermal Fibroblasts: Subsequent Connective Tissue Repair and Implications in Photoaging". *Cell Death & Differentiation* 5 (9): 792–802.

- Bortolussi S., N. Protti, M. Ferrari, I. Postuma, S. Fatemi, M. Prata, F. Ballarini, M.P. Carante, R. Farias, S.J. González, M. Marrale, S. Gallo, A. Bartolotta, G. Iacoviello, D. Nigg, and S. Altieri.** (2018). "Neutron flux and gamma dose measurement in the bnct irradiation facility at the triga reactor of the university of pavia". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 414:113 – 120.
- Brugerolle de Fraissinette A., Picarles V., Chibout S., Kolopp M., Medina J., Burtin P., Ebelin M.E.** (1999). "Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles". *Cell Biology and Toxicology* 15 (2): 121–135.
- Cadet J., Douki T.** (2011). "Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin". *Journal of Investigative Dermatology* 131 (5): 1005–1007.
- Cannon C.L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J., Klausner M.** (1994). "New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing". *Toxicology in Vitro* 8 (4): 889–891.
- Chaicharoenaudomrung N., Kunhorm P., Parinya N.** (2019). "Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling". *World Journal of Stem Cells* 11 (12): 1065–1683.
- Atul C., Dieudonné Baganizi K.V., Sahu R., Dixit S., Dennis V., Singh S., Pillai S.** (2016). "Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review". *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 1974.
- Clydesdale G. J., Dandie G. W., Muller H. K.** (2001). "Ultraviolet Light Induced Injury: Immunological and Inflammatory Effects". *Immunology and Cell Biology* 79 (6): 547–568.
- Matthew C. L., Hansbrough J.F., Spielvogel R. L., Cohen R., Bartel R.L., Naughton G.** (1991). "In Vivo Optimization of a Living Dermal Substitute Employing Cultured Human Fibroblasts on a Biodegradable Polyglycolic Acid or Polyglactin Mesh". *Biomaterials* 12 (2): 243–248.
- Corrò C., Novellademunt L., Vivian S.W. Li.** (2020). "A brief history of organoids". *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 319 (1): C151–165.
- Debels H., Hamdi M., Abberton K., Morrison W.** (2015). "Dermal Matrices and Bioengineered Skin Substitutes: A Critical Review of Current Options". *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 3 (1): e284.
- D’Errico M., Lemma T., Calcagnile A., Proietti De Santis L., Dogliotti E.** (2007). «Cell Type and DNA Damage Specific Response of Human Skin Cells to Environmental Agents». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 614 (1–2): 37–47.
- Delgrosso E., Sarcinelli G. M., Cansolino L., Riva F., Scocozza F., Conti M., Postuma I., Bortolussi S., Ferrari C.** (2021). "Bioprinting for osteosarcoma model: Methodological aspects and experimental applications". *Biomedical Science and Engineering* Vol.4.

- D’Orazio J., Stuart J., Amaro-Ortiz A., Scott T.** (2013). "UV Radiation and the Skin". *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6): 12222–12248.
- Dreher F., Fouchard F., Patouillet C., Andrian M., Simonnet J.T., Benech-Kieffer F.** (2002). "Comparison of Cutaneous Bioavailability of Cosmetic Preparations Containing Caffeine or α -Tocopherol Applied on Human Skin Models or Human Skin Ex Vivo at Finite Doses". *Skin Pharmacology and Physiology* 15 (1): 40–58.
- Duval C., Schmidt R., Regnier M., Facy V., Asselineau D., Bernerd F.** (2003). "The Use of Reconstructed Human Skin to Evaluate UV-Induced Modifications and Sunscreen Efficacy: Use of Reconstructed Skin to Evaluate UV-Induced Modifications and Sunscreen Efficacy". *Experimental Dermatology* 12 (ottobre): 64–70.
- Dymova M.A., Yurjevich Taskaev S., Richter V.A., Kuligina E.V.** (2020). "Boron Neutron Capture Therapy: Current Status and Future Perspectives". *Cancer Communications* 40 (9): 406–421.
- Falanga V.** (1998). "Apligraf Treatment of Venous Ulcers and Other Chronic Wounds". *The Journal of Dermatology* 25 (12): 812–817.
- Faller C., Bracher M., Dami M., Roguet R.** (2002). "Predictive Ability of Reconstructed Human Epidermis Equivalents for the Assessment of Skin Irritation of Cosmetics". *Toxicology in Vitro* 16 (5): 557–572.
- Ferrari C., Zonta C., Cansolino L., Clerici A.M., Gaspari A., Altieri S., Bortolussi S., Stella S., Bruschi P., Dionigi P., Zonta A.** (2009) "Selective uptake of p-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy". *Applied Radiation and Isotopes* Vol.67 (p. 341- 344).
- Fuchs E., M. Blau H.** (2020). «Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches». *Cell Stem Cell* 27 (4): 532–556.
- Fuchs E., Raghavan S.** (2002). "Getting under the Skin of Epidermal Morphogenesis". *Nature Reviews Genetics* 3 (3): 199–209.
- Gabbanini, S., E. Lucchi, M. Carli, E. Berliani, A. Minghetti, e L. Valgimigli.** (2009). "In Vitro Evaluation of the Permeation through Reconstructed Human Epidermis of Essentials Oils from Cosmetic Formulations". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50 (3): 370–376.
- Gadan MA., S Bortolussi, I Postuma, F Ballarini, P Bruschi, N Protti, D Santoro, Sabrina Stella, L Cansolino, A Clerici.** (2012) "Set-up and calibration of a method to measure ^{10}B concentration in biological samples by neutron autoradiography". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 274:51–56.

- Gambichler T., Bader A., Vojvodic M., Falk G.B., Sauermann K., Altmeyer P., Hoffmann K.** (2002). "Impact of UVA Exposure on Psychological Parameters and Circulating Serotonin and Melatonin". *BMC Dermatology* 2 (1): 6.
- Goel, A. J., Rieder M.K, Arnold H.H., Radice G.L., Krauss R.S.** (2017). "Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells". *Cell Reports* 21 (8): 2236–50.
- Gonzales K., Uy A., Fuchs E.** (2017). "Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche". *Developmental Cell* 43 (4): 387–401.
- Greinert R., Volkmer B., Henning S., Breitbart E. W., Greulich K. O, Cardoso M. C., Rapp A.** (2012). "UVA-Induced DNA Double-Strand Breaks Result from the Repair of Clustered Oxidative DNA Damages". *Nucleic Acids Research* 40 (20): 10263–10273.
- Hiroshi H., Nakagawa Y.** (1994). "Clinical Results of Long-Surviving Brain Tumor Patients Who Underwent Boron Neutron Capture Therapy". *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 28 (5): 1061–1066.
- Holick M.F.** (2004). "Sunlight and Vitamin D for Bone Health and Prevention of Autoimmune Diseases, Cancers, and Cardiovascular Disease". *The American Journal of Clinical Nutrition* 80 (6): 1678S-1688S.
- Ya-Chieh H., Lishi Li., Fuchs E.** (2014). "Emerging Interactions between Skin Stem Cells and Their Niches". *Nature Medicine* 20 (8): 847–856.
- Hussei M. R.** (2005). "Ultraviolet Radiation and Skin Cancer: Molecular Mechanisms". *Journal of Cutaneous Pathology* 32 (3): 191–205.
- Adamp S., Comoglio P., Dolfi A., Molinaro M., Papaccio G., Siracusa G., Stefanini M., Ziparo E.** VI edizione "ISTOLOGIA di Monesi". s.d. PICCIN Nuova Libreria S.P.A. Consultato 30 novembre 2021.
- Jones P.H., F. M. Watt.** (1993). "Separation of Human Epidermal Stem Cells from Transit Amplifying Cells on the Basis of Differences in Integrin Function and Expression". *Cell* 73 (4): 713–724.
- Asta J., Moan J.** (2012). "Beneficial Effects of UV Radiation Other than via Vitamin D Production". *Dermato-Endocrinology* 4 (2): 109–117.
- Meelis K., Keyes B.E., Lin M., Pasolli H.A., Genander M., Polak L., Stokes N., Zheng D., Fuchs E.** (2014). "SOX9: A Stem Cell Transcriptional Regulator of Secreted Niche Signaling Factors". *Genes & Development* 28 (4): 328–341.
- Chinatsu K., HasegawaT., Watanabe M., Nomura Y.** (2013). "Dietary Glucosylceramide Enhances Tight Junction Function in Skin Epidermis via Induction of Claudin-1". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77 (4): 867–869.
- Christian K., Shebaby W.** (2017). "UVB Damage Onset and Progression 24 h Post Exposure in Human-Derived Skin Cells". *Toxicology Reports* 4: 441–449.

- Khavkin J., Ellis D.A. F.** (2011). "Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology". *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 19 (2): 229–234.
- Byung-Soo K., Baez E.C., Atala A.** (2000). "Biomaterials for tissue engineering". *World Journal of Urology* 18 (1): 2–9.
- Vladimir K., Potapovich A., Suhan T., De Luca C., Pressi G., Dal Toso R., Korkina L.** (2008). "Plant Polyphenols against UV-C-Induced Cellular Death". *Planta Medica* 74 (5): 509–514.
- Manisha L., Goswami A., Bandyopadhyay A.** (2021). "A Periodic Development of BPA and BSH Based Derivatives in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)". *Chemical Communications* 57 (7): 827–839.
- Terry L., Fuchs E.** (2005). "Asymmetric Cell Divisions Promote Stratification and Differentiation of Mammalian Skin". *Nature* 437 (7056): 275–280.
- Lotte C., Patouillet C., Zanini M., Messenger A., Roguet R.** (2002). "Permeation and Skin Absorption: Reproducibility of Various Industrial Reconstructed Human Skin Models". *Skin Pharmacology and Physiology* 15 (1): 18–30.
- Nityanand M., Jayanthi A., Setaluri V.** (2012). "Shining Light on Skin Pigmentation: The Darker and the Brighter Side of Effects of UV Radiation". *Photochemistry and Photobiology* 88 (5): 1075–1082.
- Marnett L. J.** (2000). "Oxyradicals and DNA Damage". *Carcinogenesis* 21 (3): 361–70.
- Martínez-Santamaría L., Guerrero-Aspizua S., Del Río M.** (2012). «Skin Bioengineering: Preclinical and Clinical Applications». *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 103 (1): 5–11.
- Alea A. M., Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D., Bradley A.** (1999). "P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis". *Nature* 398 (6729): 708–713.
- Moreci R. S., Terry L.** (2020). "Epidermal Structure and Differentiation". *Current Biology* 30 (4): R144–49.
- Moss R. L.** (2014). "Critical Review, with an Optimistic Outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)". *Applied Radiation and Isotopes* 88 (giugno): 2–11.
- Sreekanth N., Agarwal C., Tilley C., Agarwal R.** (2012). "Silibinin Is a Potent Sensitizer of UVA Radiation-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Human Keratinocyte HaCaT Cells". *Photochemistry and Photobiology* 88 (5): 1135–1140.
- Kavita N.** (2016). "Boron Neutron Capture Therapy - A Literature Review". *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*.
- Netzlaff F., Lehr C.M., Wertz P.W., Schaefer U.F.** (2005). "The Human Epidermis Models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An Evaluation of Morphology and Their Suitability for Testing

Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, and Substance Transport". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60 (2): 167–178.

Nordlund J. J. (2007). "The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept". *Dermatologic Clinics* 25 (3): 271–281.

Tetsuhisa O., Furuse M. (2020). «Tight Junction Structure and Function Revisited». *Trends in Cell Biology* 30 (10): 805–817.

Palmer C. N. A., Irvine A., Terron-Kwiatkowski A., Zhao Y., Liao H., P Lee S., Goudie D.R. (2006). "Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis". *Nature Genetics* 38 (4): 441–446.

Pellevoisin C., Videau C., Briotet D., Grégoire C., Tornier C., Alonso A., Rigaudeau A.S., Bouez C., N Seyler N. (2018). "SkinEthic™ RHE for in Vitro Evaluation of Skin Irritation of Medical Device Extracts". *Toxicology in Vitro* 50 (agosto): 418–425.

Ponec M., Boelsma E., Gibbs S., Mommaas M. (2002). "Characterization of Reconstructed Skin Models". *Skin Pharmacology and Physiology* 15 (1): 4–17.

Portes P., Pygmalion M. J., Popovic E., Cottin M., Mariani M. (2002). "Use of Human Reconstituted Epidermis Episkin® for Assessment of Weak Phototoxic Potential of Chemical Compounds". *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 18 (2): 96–102.

Postuma I., Sommi P., Vitali A., Shu D., di Martino G., Cansolino L., Ferrari C. (2021). "Colocalization of Tracks from Boron Neutron Capture Reactions and Images of Isolated Cells". *Applied Radiation and Isotopes* 167 (gennaio): 109353.

Postuma I., Bortolussi S., Protti N., Ballarini F., Bruschi P., Ciani L., Ristori S., Panza L., Ferrari C., Cansolino L., Altieri S. (2016). "An improved neutron autoradiography set-up for 10b concentration measurements in biological samples". *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 21(2):123 – 128.

Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A. (2007). "Hyaluronic Acid: The Scientific and Clinical Evidence". *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60 (10): 1110–1119.

Ehrhardt P., Brandner J.M., Jensen J-M. (2008). "The Skin: An Indispensable Barrier". *Experimental Dermatology* 17 (12): 1063–1072.

Kati P., Malminen M., Aho H., Karvonen S-L., Peltonen J., Peltonen S. (2001). "Epidermal Tight Junctions: ZO-1 and Occludin Are Expressed in Mature, Developing, and Affected Skin and In Vitro Differentiating Keratinocytes". *Journal of Investigative Dermatology* 117 (5): 1050–1058.

Maddaly R., Paramesh V., Kaviya S.R., Anuradha E., Paul Solomon F.D. (2015). "3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications: 3D CELL CULTURE SYSTEMS". *Journal of Cellular Physiology* 230 (1): 16–26.

- Requena J. R., Fu M.-X., Ahmed M. U., Jenkins A. J., Lyons T. J., Thorpe S. R.** (1996). "Lipoxidation Products as Biomarkers of Oxidative Damage to Proteins during Lipid Peroxidation Reactions". *Nephrology Dialysis Transplantation* 11 (supp5): 48–53.
- Rheinwald J.G., Green H.** (1975). "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells". *Cell* 6 (3): 331–343.
- Roguet R., Régnier M., Cohen C., Dossou K.G., Rougier A.** (1994). "The Use of in Vitro Reconstituted Human Skin in Dermotoxicity Testing". *Toxicology in Vitro* 8 (4): 635–639.
- Rosdy M., Pisani A., Ortonne J.-P.** (1993). "Production of Basement Membrane Components by a Reconstructed Epidermis Cultured in the Absence of Serum and Dermal Factors". *British Journal of Dermatology* 129 (3): 227–234.
- Rosdy M., Clauss L.-C.** (1990). "Terminal Epidermal Differentiation of Human Keratinocytes Grown in Chemically Defined Medium on Inert Filter Substrates at the Air-Liquid Interface". *Journal of Investigative Dermatology* 95 (4): 409–414.
- Rosdy, M.; Bertino, B.; Butet, V.; Gibbs, S.; Ponc, M.; Darmon, M.** (1997) "**Retinoic Acid inhibits epidermal differentiation when applied topically on the stratum corneum of epidermis formed in vitro by human keratinocytes grown on defined medium**". In: *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*. Vol. 10, No. 1. pp. 39-47.
- Norimasa S.** (2013). "Tight Junction-Related Human Diseases: Tight Junction-Related Human Diseases". *Pathology International* 63 (1): 1–12.
- Karin S., Mohseni M., Kirak O., Pruszek J., Rodriguez J. R., Zhou D., Kreger B.T.** (2011). "Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation". *Cell* 144 (5): 782–795.
- Rostislav S.V., James S.L., James S.E.** (2010). "A Review of Tissue-Engineered Skin Bioconstructs Available for Skin Reconstruction". *Journal of The Royal Society Interface* 7 (43): 229–258.
- Minoru S.** (2020). "Boron Neutron Capture Therapy (BNCT): A Unique Role in Radiotherapy with a View to Entering the Accelerator-Based BNCT Era". *International Journal of Clinical Oncology* 25 (1): 43–50.
- Marian V., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J.** (2004). "Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence". *Molecular and Cellular Biochemistry* 266 (1/2): 37–56.
- Chia-Chi W., Wang S., Xia Q., He W., Yin J.J., Fu P.P., Li J.-H.** (2013). "Phototoxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in HaCaT Keratinocytes-Generation of Oxidative DNA Damage During UVA and Visible Light Irradiation". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 13 (6): 3880–3888.

Wischermann K., Popp S., Moshir S., Scharfetter-Kochanek K., Wlaschek M., de Gruijl F., Hartschuh W., (2008). "UVA Radiation Causes DNA Strand Breaks, Chromosomal Aberrations and Tumorigenic Transformation in HaCaT Skin Keratinocytes". *Oncogene* 27 (31): 4269–4280.

Rainer W., Schlenz K., Wakamatsu K., Smuda K., Nakanishi Y., Hearing V.J., Ito S. (2008). "Pigmentation Effects of Solar-Simulated Radiation as Compared with UVA and UVB Radiation". *Pigment Cell & Melanoma Research* 21 (4): 487–491.

Takuo Y., Hachiya A., Kusaka A., Sriwiriyanont P., Visscher O.M., Morita K., Muto M., Miyachi Y., Sugiyama Y., Inoue S. (2011). "Characterization of Tight Junctions and Their Disruption by UVB in Human Epidermis and Cultured Keratinocytes". *Journal of Investigative Dermatology* 131 (3): 744–752.

Xiaowei Z., Yin M., Zhang L-J. (2019). "Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis". *Cells* 8 (8): 807.

Zheng Z., Michniak-Kohn B.B. (2012). "Tissue Engineered Human Skin Equivalents". *Pharmaceutics* 4 (1): 26–41.

Zonta A., Prati U., Roveda L., Ferrari C., Zonta S., Clerici A.M., Zonta C., Pinelli T., Fossati F., Altieri S., Bortolussi S., Bruschi P., Nano R., Barni S., Chiari P., Mazzini G. "Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases" (2006). *Journal of Physics: Conference Series* Vol.41 (p. 484-495).

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la mia relatrice, la Dottoressa Federica Riva per avermi dato la possibilità di svolgere l'internato di tesi presso l'Unità di Istologia ed Embriologia Generale del Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense sotto la Sua supervisione, per il supporto, l'incoraggiamento e la premura con cui mi ha seguito durante il mio internato e nella stesura della tesi. La ringrazio per avermi coinvolto in questo ambizioso progetto e per avermi trasmesso la sua passione per la ricerca durante il mio percorso. *Ringrazio la mia professoressa naif dalle mille sfumature di gioia e vitalità, in grado di trasmettere calma e sicurezza materna nel suo modo eclettico e spagnoleggiante di agire.*

Ringrazio la Dottoressa Cinzia Ferrari e la Dottoressa Laura Cansolino, del Laboratorio di Chirurgia Sperimentale del Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche dell'Università degli Studi di Pavia per l'aiuto ricevuto durante la stesura della tesi, mettendo a mia disposizione le loro esperienze e i loro preziosi consigli.

Ringrazio la Dottoressa Patrizia Sommi, per la gentilezza e la disponibilità con cui mi ha seguito durante il mio internato e nella stesura della mia tesi, per aver messo a disposizione i suoi preziosi consigli e per l'attenzione che mi ha dedicato.

Ringrazio la Dottoressa Cristina Monti, per avermi aiutato ad analizzare e a comprendere meglio l'ambito della biostatistica, aspetto fondamentale in questa tesi.

Ringrazio Aurora Farina per avermi insegnato le nozioni pratiche degli esperimenti che sono stati fondamentali per lo sviluppo di questo progetto.

Ringrazio la Professoressa Silva Bortolussi e al Dottor Ian Postuma per la disponibilità che mi hanno dimostrato, per avermi saputo guidare in questo progetto, mettendo a disposizione le loro conoscenze in merito alla BNCT. Grazie per avermi dato la possibilità di ampliare i miei studi e per avermi offerto nuove opportunità future.

Ringrazio il Professore Calligaro per avermi aiutato a comprendere fino in fondo l'utilizzo del microscopio ottico, grazie per l'immensa saggezza che mi ha trasmesso. Resterai per sempre il mio professore *spettacoloso*.

Ringrazio la mia collega Stefy per aver condiviso con me tutti i momenti di ansia, gioia e nervosismo nelle lunghe giornate di laboratorio. Grazie per aver condiviso giorni di ordinaria follia nella 'stanzetta dell'immuno', grazie per aver condiviso con me il mancato recupero degli anticorpi, grazie per le innumerevoli mangiate e risate nel bunker istologico.

Ringrazio Elena per avermi sostenuto sempre, dall'inizio alla fine. Grazie per la fiducia che hai riposto in me sin dal primo giorno. Grazie per aver sopportato le mie crisi quotidiane, grazie per aver creduto in me nei momenti di sconforto, grazie per avermi migliorato alla fine di questo cammino intrapreso insieme, grazie per aver compreso i miei silenzi. Grazie perché questo traguardo è in parte merito tuo.

Ringrazio Claudia per le giornate di studio matto e disperato in casa Simonetta, grazie per aver condiviso con me momenti di disperazione, grazie per avermi sollevato dai pensieri negativi, grazie per avermi rallegrato con la tua spontaneità e sincerità. Grazie per aver condiviso con me questo percorso di crescita culturale e personale.

Ringrazio la mia 'famiglia di Pavia' per aver condiviso con me questo percorso intenso e ricco di emozioni.

Ringrazio il mio amico di sempre... grazie per non avermi fatto mai sentire solo nonostante la lontananza.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, una costante nella mia vita. Se tutto ciò si sta realizzando è merito loro, con amore e sacrificio mi avete dato l'opportunità di crescere e realizzarmi. Questo traguardo inizialmente era un semplice pensiero, ora... grazie a voi è diventato realtà.

Grazie a tutti coloro che hanno riposto fiducia in me.