

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

Corso di Laurea Magistrale Interdipartimentale in  
Bioteχνologie Mediche e Farmaceutiche

**Valutazione degli effetti della Terapia per Cattura  
Neutronica nel Boro (BNCT) sulla proliferazione di  
cheratinociti umani in costrutti epidermici *in vitro***

Relatore:

***Dott.ssa Federica Riva***

Correlatori:

***Dott. Ian Postuma***

***Dott.ssa Laura Cansolino***

Tesi di Laurea Magistrale in  
Bioteχνologie Mediche e Farmaceutiche di

***Stefania Ricci***

Anno Accademico 2020/2021



# SOMMARIO

## GLOSSARIO

## ABSTRACT

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE .....	1
1.1 CUTE.....	1
1.1.1 STRUTTURA FONDAMENTALE E COMPOSIZIONE CELLULARE .....	1
1.1.2 EPIDERMIDE: COMPOSIZIONE CELLULARE.....	2
1.1.3 PROLIFERAZIONE CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO.....	5
1.2 INGEGNERIA TISSUTALE .....	7
1.3 INGEGNERIA TISSUTALE CUTANEA .....	10
1.3.1 CENNI STORICI .....	10
1.3.2 VANTAGGI DELLA TRIDIMENSIONALITÀ.....	11
1.3.3 INTERFACCIA GAS-LIQUIDO.....	12
1.4 MODERNI SOSTITUTI CUTANEI .....	12
1.4.1 CARATTERISTICHE E APPLICAZIONI .....	12
1.4.2 NASCITA DEI MODELLI SPERIMENTALI CUTANEI .....	15
1.4.3 CLASSIFICAZIONE DEI MODELLI.....	16
1.5 <i>EPISKIN: SKINETHIC™</i> .....	19
1.5.1 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO.....	19
1.5.2 <i>MARKERS</i> SPECIFICI .....	20
1.5.3 STUDI DI CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO .....	21
1.5.4 VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'UTILIZZO DI RHE .....	26
1.6 RADIAZIONE IONIZZANTE .....	27
1.6.1 RADIOTERAPIA CONVENZIONALE .....	28
1.7 TERAPIA PER CATTURA NEUTRONICA NEL BORO.....	28
1.7.1 STORIA DELLA BNCT .....	29
1.7.2 PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO .....	32
1.7.3 AGENTI VEICOLANTI .....	35

1.7.4 MORTE CELLULARE INDOTTA DA BNCT .....	37
1.7.5 MISURA DELLA CONCENTRAZIONE DEL BORO: AUTORADIOGRAFIA NEUTRONICA .....	38
1.7.6 EFFETTI DI BNCT SU CUTE UMANA NORMALE.....	39
1.7.7 EFFETTO DELLA RADIAZIONE SULL'EPIDERMIDE .....	40
<b>CAPITOLO 2: STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>43</b>
2.1 TEST DI IRRITAZIONE CUTANEA .....	43
2.2 FOTOTOSSICITÀ.....	44
2.3 <i>SKINETHIC™</i> E BNCT .....	45
<b>CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>48</b>
<b>CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>50</b>
4.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE .....	50
4.1.1 SCELTA DEL MODELLO: <i>SKINETHIC™</i> .....	50
4.1.2 INCUBAZIONE E ASSORBIMENTO DI BPA.....	51
4.1.3 IRRAGGIAMENTO CON NEUTRONI.....	52
4.1.4 IRRAGGIAMENTO CON FOTONI .....	53
4.1.5 FISSAZIONE, DISIDRATAZIONE, INCLUSIONE E TAGLIO.....	54
4.2 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA ED EOSINA E MISURAZIONE DELLO SPESSORE DELLE SEZIONI .....	55
4.3 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE .....	58
4.3.1 SAGGIO DI INCORPORAZIONE DELLA BROMODESSOSIURIDINA (BrdU).....	58
4.3.2 ESPRESSIONE DELL'ANTIGENE NUCLEARE DI PROLIFERAZIONE CELLULARE (PCNA) .....	62
4.3.3 ESPRESSIONE DELL'ANTIGENE NUCLEARE Ki-67 .....	64
<b>CAPITOLO 5: RISULTATI .....</b>	<b>67</b>
5.1 CAMPIONI IRRAGGIATI CON BNCT .....	67
5.1.1 ANALISI MORFOLOGICA .....	67
5.1.2 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA.....	77
5.1.3 ANALISI STATISTICA DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA .....	93
5.2 CAMPIONI IRRAGGIATI CON RAGGI X.....	96

5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA .....	96
5.2.2 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICHE DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA.....	99
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE.....	104
CAPITOLO 7: CONCLUSIONI.....	112
BIBLIOGRAFIA.....	115
SITOGRAFIA.....	122
RINGRAZIAMENTI.....	123

## GLOSSARIO

**3D:** tridimensionale

**ASC:** (*Adult Stem Cells*): Cellule Staminali Adulte

**BNCT:** (*Boron Neutron Capture Therapy*): Terapia per Cattura Neutronica nel Boro

**BNL:** Brookhaven National Laboratory

**BPA:** (*Boron Phenyl Alanine*): Boro Fenil Alanina

**BrdU:** (*Bromodeoxyuridine*): Bromodesossipuridina

**CE:** condizione di equilibrio degli elettroni

**CTR:** Controllo

**DAB:** (*3,3'-Diaminobenzidine*): 3,3'-Diamminobenzidina

**ECM:** (*Extracellular Matrix*): Matrice Extracellulare

**Gy:** Gray

**H&E:** (*Haematoxylin and Eosin*): Ematossilina ed Eosina

**HSE:** (*Human Skin Equivalent*): Equivalente Cutaneo Umano

**IL-1 $\alpha$ :** Interleuchina 1 $\alpha$

**IL-8:** Interleuchina 8

**LDH:** (*Lactate Dehydrogenase*): Lattico Deidrogenasi

**LET:** (*Linear Energy Transfer*): Trasferimento Lineare di Energia

**MIT:** Massachusetts Institute of Technology

**MCNP:** *Monte Carlo N-Particle Transport*

**NTCP:** (*Normal Tissue Complication Probability*): Probabilità di Complicazioni in Tessuto Normale

**PBS:** (*Phosphate Buffer Solution*): Soluzione di Tampone Fosfato

**PCNA:** (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*): Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare

**RHE:** (*Reconstructed Human Epidermis*): Epidermide Umana Ricostruita

**ROS:** (*Reactive Oxygen Species*): Specie Reattive dell'Ossigeno

**SGM:** (*SkinEthic™ Grow Medium*): mezzo di coltura per *SkinEthic™*

**SMM:** (*SkinEthic™ Maintenance Medium*): mezzo di mantenimento per *SkinEthic™*

**SSNTD:** (*Solid State Nuclear Track Detector*): Rilevatore di Tracce Nucleari in Stato Solido

**TAOrMINA:** Trattamento Avanzato di Organi Mediante Irraggiamento Neutronico e Autotrapianto

**TBS:** (*Tris Buffered Saline*): Tampone Tris Salino

## ABSTRACT

Il presente lavoro sperimentale di tesi ha utilizzato il sostituto cutaneo *SkinEthic™ RHE*, *Reconstructed Human Epidermis* come modello di epidermide umana ricostruita *in vitro* da cheratinociti umani normali seminati su un filtro inerte in policarbonato e coltivati in un mezzo di coltura all'interfaccia gas-liquido.

Per questo lavoro è stato scelto il modello *SkinEthic™* per la sua elevata analogia con il tessuto epidermico *in vivo*: sono state effettuate analisi istologiche, morfologiche e proliferative, test di irritazione cutanea, di fototossicità che hanno confermato l'attendibilità della risposta dei costrutti alle differenti analisi, analoga a quella osservata sul tessuto nativo.

La terapia per cattura neutronica nel boro, *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT) è un'innovativa modalità di radioterapia contro il cancro, con l'obiettivo di trattare tumori solidi che difficilmente rispondono alle terapie tradizionali. La BNCT prevede la somministrazione di un composto marcato con boro-10 ( $^{10}\text{B}$ ), non radioattivo, ad elevata selettività per le cellule tumorali, che lo internalizzano attraverso i recettori LAT1, cui segue una fase di irraggiamento con neutroni termici o epitermici a bassa energia che si termalizzano in profondità nei tessuti.

Gli atomi del composto borato  $^{10}\text{B}$ , una volta assorbiti i neutroni, accumulano un elevato livello di energia che causa la reazione esotermica:  $^{10}\text{B} + n \rightarrow \alpha + ^7\text{Li}$  all'interno di una singola cellula, con conseguente danno al DNA che la cellula non riesce a riparare. Questo causa la distruzione selettiva delle cellule maligne, preservando la vitalità delle cellule sane circostanti.

Questo studio ha l'obiettivo di indagare gli effetti radiobiologici dell'irraggiamento con radiazione al boro su campioni di costrutti *SkinEthic™*, per capire quali siano gli effetti della radiazione sull'epidermide umana normale.

A tale scopo, sono state effettuate analisi morfologiche attraverso la colorazione con Ematossilina ed Eosina unite ad analisi immunoistochimiche che hanno permesso di valutare sia la percentuale di cellule proliferanti all'interno dei singoli campioni (saggio di incorporazione di Bromo-Desossi-Uridina, BrdU) sia la percentuale di cellule positive all'espressione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA).

È stata confermata la corrispondenza dell'istoarchitettura dell'equivalente epidermico al costruito nativo e l'analisi morfologica ha evidenziato una progressiva degradazione del costruito nel tempo e in seguito a differenti dosi di radiazione neutronica.

L'immunomarcatura anti BrdU ha mostrato che l'aumento della percentuale di cellule proliferanti non è direttamente proporzionale all'aumento della dose di radiazione somministrata. Risultato analogo per l'espressione di PCNA. È stato osservato un picco di positività ricorrente al tempo T2, per tutti i campioni analizzati.

L'elevata variabilità tra i differenti costrutti rende difficile una standardizzazione dei risultati, motivo per cui sarebbe auspicabile, in futuro, incrementare il numero di campioni per ottenere una casistica adeguata per analisi statisticamente significative.

Le stesse analisi sono state eseguite su costrutti irraggiati con radiazione con fotoni, radiazione di riferimento utilizzata nella radioterapia convenzionale, con l'obiettivo di confrontare gli effetti delle due radiazioni e individuare una dose di radiazione neutronica fotone-equivalente.

## CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

### 1.1 CUTE

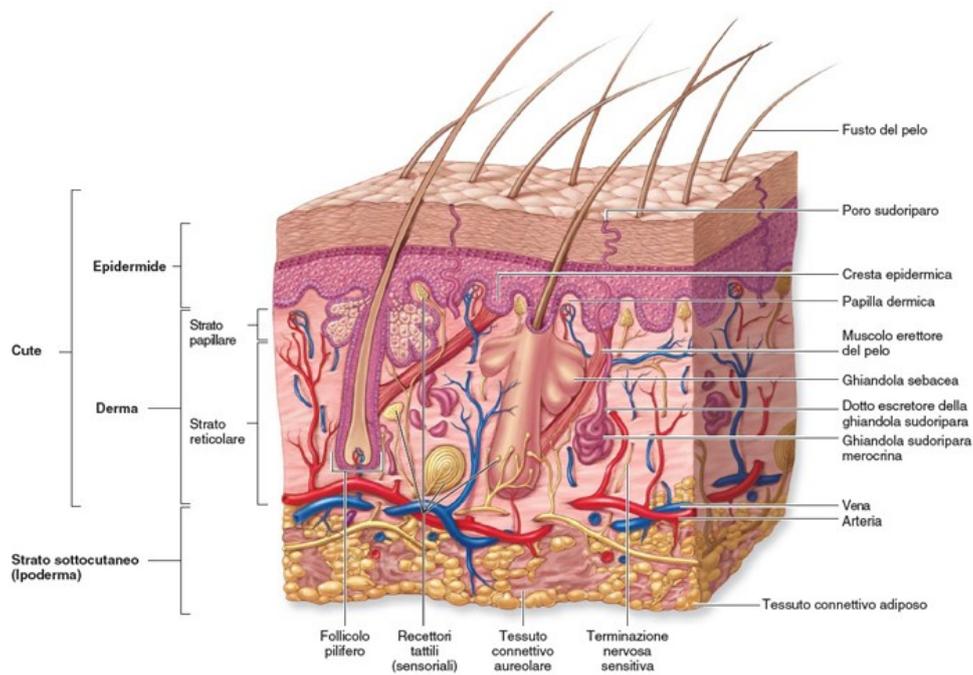
La cute è il più ampio organo del corpo umano, costituendo il 15-20% circa del peso corporeo totale e presentando nell'adulto una superficie esposta all'ambiente esterno di circa 1,5-2 m<sup>2</sup>. È una barriera chimica e meccanica da e verso l'ambiente esterno grazie alle sue molteplici funzioni: è sede di attività metaboliche e regola il bilancio idrico, la protezione chimica, termica e meccanica, la sensibilità e la termoregolazione. (Kono T., Miyachi Y., e Kawashima M. 2021).

#### 1.1.1 STRUTTURA FONDAMENTALE E COMPOSIZIONE CELLULARE

La cute umana è costituita da tre strati istologici. Partendo dal più esterno, è possibile riconoscere:

1. Epidermide: epitelio pavimentoso pluristratificato, caratterizzato dalla presenza di quattro strati cellulari diversi, che diventano cinque in specifiche regioni corporee. Le cellule che principalmente compongono l'epidermide sono i cheratinociti, in grado di sintetizzare cheratine, proteine che consentono alla cute di svolgere la sua funzione protettiva. Oltre ai cheratinociti, sono presenti le cellule di *Merkel*, con funzione recettoriale; i melanociti, per proteggere dalla luce solare; le cellule di *Langerhans*, cellule dendritiche coinvolte nella difesa da microorganismi.
2. Derma: separato dall'epidermide dalla membrana basale, è tessuto connettivo denso con fibre disposte orizzontalmente. È vascolarizzato e innervato.
3. Ipoderma: tessuto adiposo associato al tessuto connettivo denso del derma profondo, contenente vasi sanguigni e nervi. (Young B. et al., s.d.).

Fanno parte della pelle anche gli annessi cutanei, ovvero strutture specializzate quali follicoli piliferi, ghiandole sudoripare e ghiandole sebacee con i rispettivi dotti, corpuscoli sensoriali che si localizzano nel derma o nella regione connettivale sottostante. (Fig. 1).



**Figura 1.** Disegno di spaccato tridimensionale di cute umana.

(McKinley M. et al., 2016)

### 1.1.2 EPIDERMIDE: COMPOSIZIONE CELLULARE

A livello cellulare, partendo dal distretto più profondo dell'epidermide, è possibile identificare cinque differenti strati (Fig. 2), ognuno dei quali è caratterizzato da una diversa morfologia:

**STRATO BASALE:** è lo strato più profondo dell'epidermide, che poggia direttamente sulla membrana basale, che lo connette al derma sottostante. È definito anche "strato germinativo" perché composto principalmente da cheratinociti proliferanti e dalla nicchia di cellule staminali adulte, *Adult Stem Cells* (ASC) da cui derivano i cheratinociti di tutti gli strati dell'epidermide. Le divisioni cellulari a cui le ASC sono sottoposte consentono sia il loro autorinnovamento, sia il mantenimento della popolazione cellulare di tutto il tessuto epidermico. In questo strato basale i cheratinociti sono organizzati in un singolo strato, hanno una forma cubica o colonnare e proliferano per mitosi, a cui segue l'inizio del processo differenziativo, che conduce alla loro maturazione e migrazione verso lo strato corneo, consentendo il rapido *turnover* del tessuto attraverso la continua ripopolazione di tutti gli strati cellulari più superficiali. I cheratinociti sintetizzano citocheratine, proteine del citoscheletro con funzioni strutturali e igroscopiche, coinvolte anche nella migrazione e nel differenziamento cellulare. In questo strato sono presenti, tra i cheratinociti, anche le cellule di *Merkel*. (Lee T. e Friedman A. 2016; Young B. et al., s.d.).

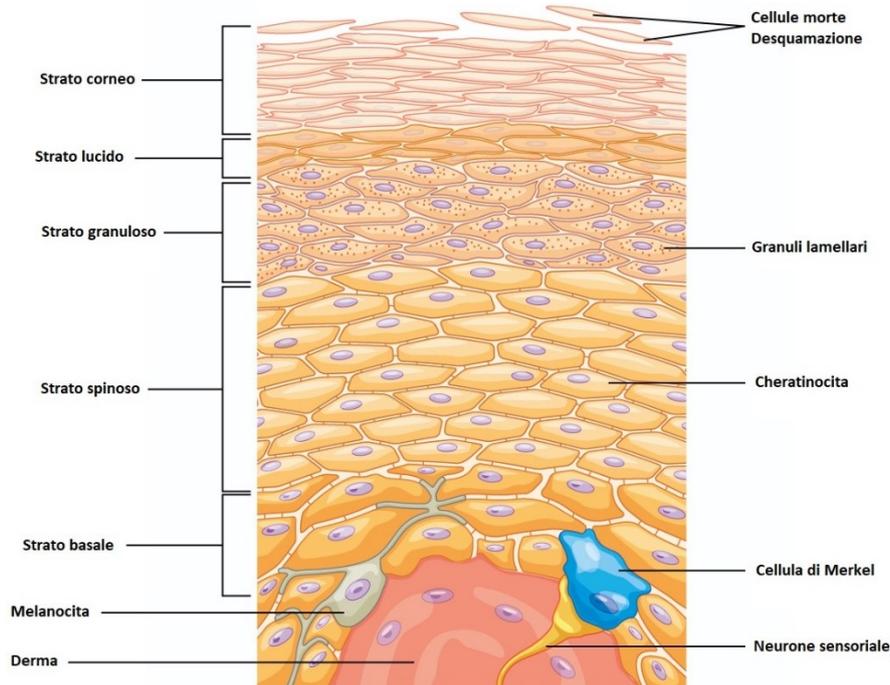
**STRATO SPINOSO:** i cheratinociti sono disposti in più file e hanno una forma poliedrica; sono impegnati in un'intensa attività di sintesi proteica. Le cellule producono tonofilamenti, ovvero filamenti intermedi di cheratine che entrano nella costituzione del citoscheletro della cellula, mantenendone la forma ed evitandone il collasso nella formazione dei desmosomi, specifiche strutture intercellulari tra cheratinociti adiacenti. Queste giunzioni aderenti puntiformi, che si sviluppano tra le estroflessioni citoplasmatiche di cellule contigue, sono responsabili del caratteristico aspetto spinoso di questo strato cellulare. Tra i cheratinociti di questo strato spinoso sono presenti anche melanociti e cellule di *Langerhans*. (Losquadro W. D. 2017; Young B. et al., s.d.).

**STRATO GRANULOSO:** comprende da tre a cinque strati di cellule dalla forma irregolare, quasi appiattite, che sintetizzano cheratoialina e cheratina. La cheratoialina è accumulata in granuli privi di membrana che circondano i filamenti di cheratina (Martini V. et al. 2012). Sono granuli basofili, contenenti glicolipidi e proteine ricche di cisteina,

come la loricrina, l'involucrina e la filaggrina; queste proteine, interagiscono con le fibrille di citocheratina, agglutinandole. (Young B. et al., s.d.; Yousef H., Alhajj M., e Sharma S. 2022).

**STRATO LUCIDO:** questo strato è presente tra lo strato granuloso e quello corneo, osservabile solamente nella cute spessa, in corrispondenza soprattutto della pianta dei piedi e nel palmo delle mani. È un sottile *layer* cellulare liscio e traslucido di cellule eosinofile molto appiattite. Gli organuli citoplasmatici iniziano il processo di degradazione, così come il nucleo che diventa picnotico. I filamenti di cheratina si impaccano sempre più e sono presenti anche granuli avvolti da membrana che rilasciano all'esterno della cellula una sostanza ricca in lipidi, l'eleidina, una lipoproteina derivata dalla cheratoialina che conferisce allo strato il tipico aspetto trasparente e maggior impermeabilità. (Biga et al. 2019). Questa proteina crea infatti uno strato idrorepellente a protezione della cute che ostacola lo scambio di sostanze tra l'interno e l'esterno delle cellule degli strati più superficiali. I desmosomi sono ancora visibili tra cellule adiacenti. (Martini V. et al. 2012).

**STRATO CORNEO:** strato squamoso, cheratinizzato, composto da corneociti che formano scaglie e lamine di cheratina. I corneociti derivano dal differenziamento terminale dei cheratinociti che si appiattiscono e perdono il loro nucleo, trasformandosi in residui cellulari. Questi sono circondati da una matrice cheratinizzata, ricca di lipidi apolari che permettono alla cute di svolgere la propria funzione protettiva meccanica e chimica e di regolazione dell'evaporazione d'acqua *trans*-epidermica. (Proksch E., Brandner J. M., e Jensen J. M. 2008; Young B. et al., s.d.).



**Figura 2.** Disegno relativo alla composizione cellulare degli strati epidermici.

*Modificata da Biga L. M. et al., 2019*

### 1.1.3 PROLIFERAZIONE CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO

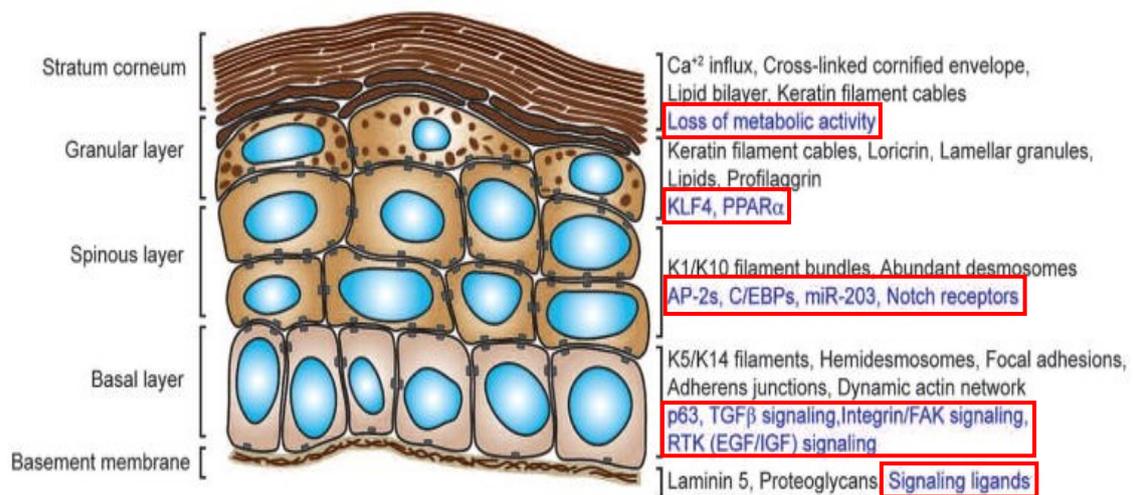
Le cellule dello strato basale dell'epidermide sono altamente proliferanti e permettono un continuo *turnover* tissutale, in risposta a segnali chimici e biomeccanici modulati dal contatto intercellulare. (Gallegos-Alcalá P. et al. 2021).

È stato dimostrato che la cute ha sia una componente epiteliale che una componente mesenchimale, che partecipa al differenziamento e al mantenimento della popolazione dei cheratinociti epidermici (Choi H. R. et al. 2015). Le cellule staminali mesenchimali adulte (ASC), in questo caso epidermiche, sono localizzate all'interno di strutture che prendono il nome di nicchie, composte da cellule staminali e da cellule differenziate adiacenti che secernono componenti della matrice extracellulare e altri fattori che contribuiscono alla creazione del microambiente necessario al mantenimento della ASC

nel suo stato indifferenziato. Questo permette alla ASC di autorinnovarsi e, di rispondere ad un adeguato stimolo esterno attivando il differenziamento cellulare. (Fig. 3) (Fuchs E., Tumber T., e Guasch G. 2004).

La fase di maturazione inizia quando la cellula che lascia lo strato basale perde la capacità di replicarsi e inizia la sua migrazione verso i successivi strati epidermici. È un processo biochimico durante il quale le cellule subiscono numerosi cambiamenti morfologici per poi andare incontro a morte nella fase terminale della loro migrazione, nello strato corneo. (Wong R. et al. 2016).

I processi di proliferazione e differenziamento epidermici sono regolati da specifici *pathways* in cui sono coinvolti alcuni fattori di trascrizione come c-Myc, che promuove il differenziamento terminale della ASC epidermica la quale migrerà, differenziandosi, dalla nicchia allo strato corneo, e p63, fattore di trascrizione presente in sei isoforme che mantiene il potenziale proliferativo dei cheratinociti basali e la cui espressione deve essere gradualmente sottoregolata affinché avvenga la differenziazione terminale dei cheratinociti. (Fig.4) (Koster M. e Roop D. R. 2004; Watt F. M. 1998).



**Figura 4.** Meccanismi molecolari associati al differenziamento epidermico.

(Fuchs, 2009)

Lo studio di Livingstone del 1992 dimostra l'importanza di p53 nella progressione del ciclo cellulare (Livingstone L. R. et al. 1992). Il gene TP53 codifica la proteina p53 che rileva la presenza di DNA danneggiato e arresta le cellule nella fase G1 del ciclo cellulare, affinché si verifichino i processi di riparazione prima che il DNA alterato si replichi e sia trasmesso alle cellule figlie. Una mutazione su un unico allele a carico di TP53 permette alle cellule di avere un comportamento simile alle cellule *wild-type*, con blocco della progressione del ciclo cellulare; cellule che perdono il secondo allele di TP53 vanno incontro ad una proliferazione incontrollata, probabilmente causata da cambiamenti nella progressione del ciclo cellulare. (Livingstone L. R. et al. 1992).

Anche i fattori di trascrizione omologhi a p53, come p63, sono coinvolti nella proliferazione cellulare e nella progressione del ciclo cellulare. In particolare, dallo studio di Mills del 1999 è emerso che i topi privi di p63 nascono vivi ma hanno importanti difetti di sviluppo, con arti assenti o troncati. (Mills A. A. et al. 1999).

Inoltre, topi con ridotti livelli di espressione di p63 hanno una cute scarsamente stratificata e che non esprime marcatori di differenziamento. Strutture dipendenti dalle interazioni epidermico-mesenchimali durante lo sviluppo embrionale, come follicoli piliferi, denti e ghiandole mammarie, sono assenti nei topi carenti di p63. Pertanto, p63 è essenziale per diversi aspetti della differenziazione ectodermica durante l'embriogenesi. (Mills A. A. et al. 1999).

## **1.2 INGEGNERIA TISSUTALE**

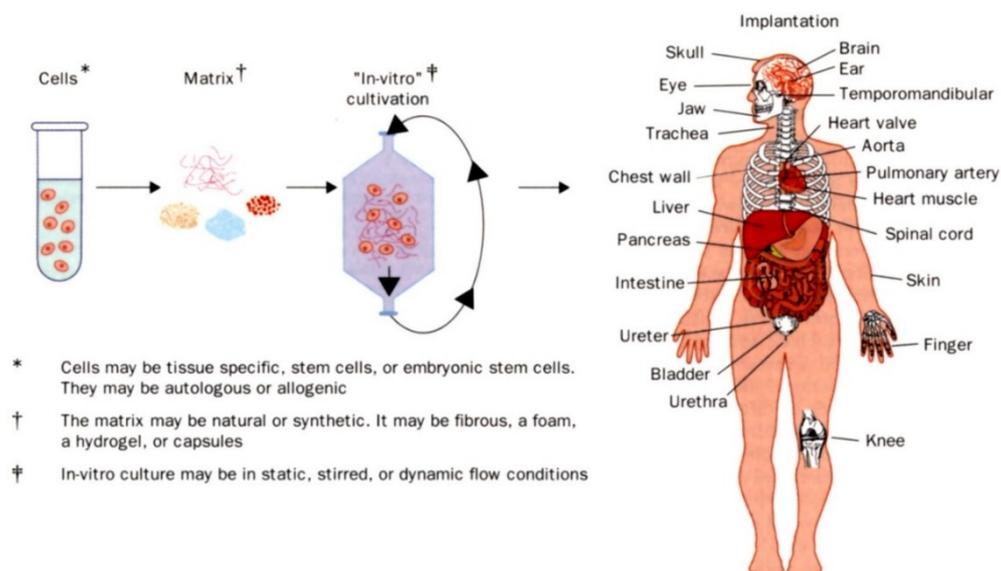
L'ingegneria tissutale è una scienza multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e di altre diverse discipline scientifiche per sviluppare sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni tissutali. (Langer R. e Vacanti J. P. 1993).

La strategia dell'ingegneria tissutale prevede l'impiego di tre elementi principali (Fig. 5):

**CELLULE:** isolate da fonti istologiche differenti, coltivate ed espanse *in vitro*, creando una coltura cellulare numericamente ampia e disponibile per la creazione del tessuto ingegnerizzato (Langer R. e Vacanti J. P. 1993).

**BIOMATERIALE:** impiegare un materiale biocompatibile appropriato, una rete tridimensionale di macromolecole naturali o sintetiche che fornisca supporto fisico e biochimico alle cellule e che possa avere forma e dimensioni desiderate. Lo *scaffold* è utilizzato come substrato su cui le cellule isolate vengono seminate (sistema aperto) oppure per l'incapsulamento cellulare (sistema chiuso). (Belleghem S. et al. 2020; Langer R. e Vacanti J. P. 1993).

**BIOREATTORE:** le cellule, uniformemente seminate sullo *scaffold*, sono poste in coltura in modo da ricreare il normale microambiente, con gli stimoli biochimici, metabolici o meccanici a cui le cellule sono fisiologicamente sottoposte. È inoltre possibile mimare uno stato patologico per studiarne la fisiopatologia. (Selden C. e Fuller B. 2018).



**Figura 5.** Elementi principali coinvolti e applicazioni di tissue engineering.

(Vacanti J. P. e Langer R. 1999)

Il primo esempio di applicazione di ingegneria tissutale risale al 1933 quando Bisceglie incapsulò cellule tumorali di topo all'interno di una membrana polimerica, inserendole successivamente nella cavità addominale di un maiale. La vitalità cellulare venne mantenuta abbastanza a lungo da dimostrare la mancata attivazione del sistema immunitario. (Vacanti J. P. e Langer R. 1999).

Di fatto, il primo organo ad essere stato ingegnerizzato fu la cute, grazie ai risultati ottenuti dagli esperimenti di Rheinwald and Green nel 1975 (Rheinwald J. G. e Green H. 1975), che dimostrarono *in vitro* la presenza di cheratinociti epidermici con capacità clonogenica, da poter espandere ed utilizzare per i primi tentativi di epidermide ingegnerizzata. (Rheinwald J. G. e Green H. 1975).

La multidisciplinarietà dell'ingegneria tissutale permette la sua potenziale applicabilità in molteplici settori nel trattamento di numerose patologie dell'organismo umano: molte delle procedure sono per lo più ancora sperimentali e costose ma sono stati impiantati piccoli vasi, innesti cutanei, cartilaginei e ossei. Inoltre, tessuti di organi più complessi sono stati ricreati con successo in laboratorio come vescica, rene e tessuto epatico ma non è ancora possibile l'applicabilità clinica nei pazienti; gli organi ancor più complessi dal punto di vista istologico e funzionale, come cuore e polmone, rappresentano ancora un ambizioso obiettivo da raggiungere per l'ingegneria tissutale. Tuttavia, alcuni dei tessuti tridimensionali ingegnerizzati rappresentano una valida alternativa ai classici modelli bidimensionali di ricerca, dalla clinica alla biologia e alla farmacologia, in quanto rappresentano un'alternativa sperimentale ai modelli animali *in vivo*. («Tissue Engineering and Regenerative Medicine», s.d.).

## **1.3 INGEGNERIA TISSUTALE CUTANEA**

### **1.3.1 CENNI STORICI**

I primi tentativi di applicazione di ingegneria tissutale cutanea risalgono all'inizio degli anni '80, quando cellule cutanee sono state seminate su fogli di collagene nel tentativo di ricreare pelle di nuova sintesi che promuovesse la rigenerazione tissutale. (Langer R. 2000).

Nel lavoro di Bell del 1981 sono state isolate cellule cutanee di ratto, poi seminate su reticoli di collagene. (Bell E. et al. 1981).

Questi *graft* dermo-equivalenti sono stati posti in coltura e hanno permesso di ottenere lembi di tessuto di diverse dimensioni. Il loro innesto sugli stessi donatori di cellule cutanee non ha mostrato rigetto, era presente vascolarizzazione e riempimento della ferita. La durata dei *graft* era buona e dopo dieci settimane il loro spessore era la metà dello strato epidermico adiacente l'innesto. (Bell E. et al. 1981).

Nel lavoro di Burke del 1981, è stata utilizzata cute artificiale per favorire la fisiologica rimarginazione di ferite dovute a ustioni.

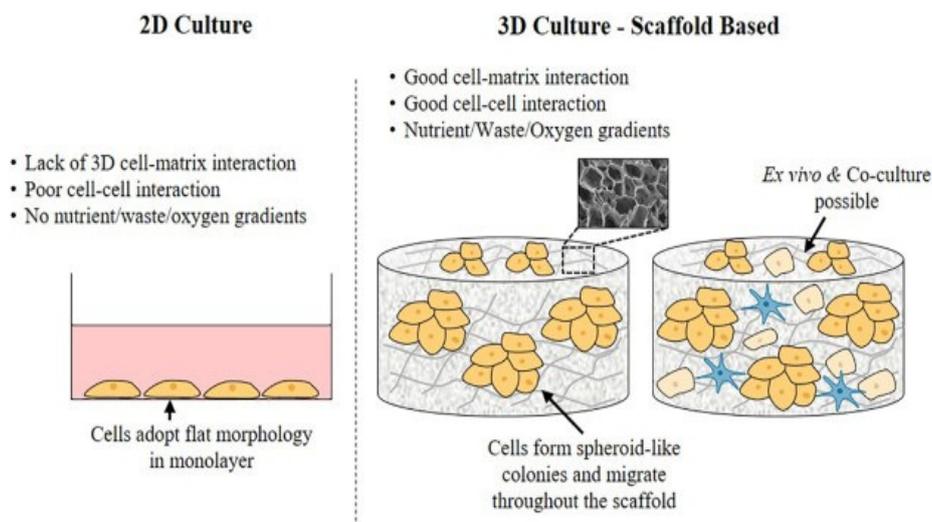
È stato utilizzato un *graft multilayer*, composto da uno strato epidermico temporaneo e un derma fibrillare di collagene poroso con l'obiettivo di avere un modello per generare tessuto di nuova sintesi a cui associare la contemporanea biodegradazione del supporto.

Dopo l'innesto, la porzione dermica era popolata da fibroblasti e vascolarizzata, manteneva caratteristiche anatomiche e fisiologiche del derma normale, promettendo così un miglioramento funzionale ed estetico, ad evidenziare la sua potenziale applicazione nel paziente ustionato. (Burke J. F. et al. 1981).

### 1.3.2 VANTAGGI DELLA TRIDIMENSIONALITÀ

Con il tempo, i ricercatori hanno evidenziato i limiti delle colture cellulari bidimensionali (2D), che non mimano perfettamente la complessità del microambiente tissutale *in vivo*. La possibilità di interazione intercellulare è ridotta, così come gli scambi tra le singole cellule e la matrice extracellulare (ECM). Inoltre, le cellule coltivate su piastra mostrano una minor capacità di rispondere ai segnali regolatori.

Le colture tridimensionali (3D) permettono alle cellule una maggior espressione dei recettori cellulari di superficie, conferiscono un'aumentata velocità proliferativa e di sintesi della matrice extracellulare, e migliorano la densità cellulare e le funzioni metaboliche. (Fig. 6).



**Figura 6.** Colture 2D vs colture 3D. La coltura cellulare tridimensionale favorisce le interazioni cellula-matrice e le interazioni cellula-cellula, maggiori rispetto a una coltura bidimensionale.

(Redmond J. et al., 2021)

È stato dimostrato che lo stesso tipo cellulare, seminato parallelamente in coltura 2D e 3D, manifesta evidenti differenze nel fenotipo, nell'attivazione di *pathways* di

segnalazione, nella migrazione cellulare e nei meccanismi di risposta ai farmaci (Mazzoleni G., Di Lorenzo D., e Steimberg N. 2009).

### **1.3.3 INTERFACCIA GAS-LIQUIDO**

Per l'ingegneria tissutale cutanea, è di fondamentale importanza l'utilizzo di un sistema di coltura tridimensionale, così come un'interfaccia aria-liquido. Nello studio condotto da Pruniéras del 1983 (Pruniéras M., Régnier M., e Woodley D. 1983) è stato infatti dimostrato il ruolo di questo film "aria-mezzo di coltura", che permette il contatto diretto tra i cheratinociti e l'ossigeno ambientale, per favorire il completo differenziamento dei cheratinociti stessi, fino allo strato corneo. La mancanza di questa interfaccia altererebbe drasticamente la condizione di crescita delle colture cellulari. (Pruniéras M., Régnier M., e Woodley D. 1983).

## **1.4 MODERNI SOSTITUTI CUTANEI**

### **1.4.1 CARATTERISTICHE E APPLICAZIONI**

In seguito agli studi precedentemente eseguiti, oggi è possibile sviluppare sostituti cutanei umani utilizzabili come modelli *in vitro*, alternativi all'uso di animali, che trovano un'ampia applicabilità a scopo di ricerca.

Gli equivalenti dell'epidermide umana, *human skin equivalents* (HSE), sono utilizzati per:

- test di tossicità cutanea,
- analizzare gli effetti farmacologici e tossicologici di principi attivi o formulazioni cosmetiche,

- valutare la fototossicità da radiazioni UV,
- studiare condizioni patologiche della pelle, come psoriasi e diabete o il processo di invasione del melanoma. (do Nascimento Pedrosa T. et al. 2021).

Le cellule che costituiscono i diversi HSE derivano dall'isolamento e dalla coltura primaria di cellule cutanee umane, seminate su membrane di supporto che ne promuovono il differenziamento e la proliferazione, al fine di ricreare il tessuto epidermico. Vengono utilizzati cheratinociti umani normali isolati dal tessuto cutaneo per i sostituti epidermici, fibroblasti per i sostituti dermici e una co-coltura di cheratinociti e fibroblasti per i sostituti dermo-epidermici. (Przekora A. 2020).

Le membrane di supporto su cui le cellule sono seminate sono di origine naturale o sintetica e hanno una struttura semplice come i filtri inerti (Rosdy M. e Clauss L. C. 1990), il derma non associato all'epidermide (Boelsma E., Verhoeven M. C. H., e Ponc M. 1999) e le matrici di collagene, oppure una struttura più complessa, come un reticolo di biopolimero derivato da collagene cutaneo bovino e condroitin-6-solfato (Boyce S. et al. 1990) o un non-tessuto fibroso risultato dall'esterificazione dell'acido ialuronico con alcol benzilico (Stark H. J. et al. 2004).

È stato dimostrato che i modelli di epidermide ricostruita assumono un'architettura tridimensionale tipica dell'epidermide naturale del tessuto cutaneo normale, in cui è possibile riconoscere i quattro strati epidermici: strato basale, strato spinoso, strato granuloso e strato corneo (Rosdy M. e Clauss L. C. 1990).

Questa organizzazione epidermica è il risultato del differenziamento e della maturazione dei cheratinociti proliferanti che, dallo strato basale, migrano verso gli strati epidermici più superficiali. (Rosdy M. e Clauss L. C. 1990).

Cambiamenti morfologici accompagnano la maturazione dei cheratinociti, i quali assumono lo stesso aspetto delle cellule epiteliali che normalmente si osservano nei diversi strati:

- monostrato di cellule colonnari nello strato basale;
- multistrato di cellule poliedriche nello strato spinoso;
- cellule con citoplasma ricco di granuli di cheratoialina nello strato granuloso;
- cellule appiattite e anucleate nello strato corneo, completamente cheratinizzato (Guiraud B. et al. 2014).

L'ingegneria tissutale cutanea fornisce modelli tissutali che trovano applicazione sia nel campo della ricerca sperimentale sia nell'ambito clinico-terapeutico.

Numerosi studi che hanno condotto alla formulazione di sostituti bioattivi della cute che, in caso di lesione, sono in grado di guidare il processo di autoriparazione e rallentare la formazione del tessuto cicatriziale. Si tratta di innesti (*graft*) che vengono applicati per promuovere la guarigione di ustioni dal primo al terzo grado, ulcere diabetiche, piaghe da decubito, varici e problemi vascolari. (Balasubramani M., Kumar T. R., e Babu M. 2001).

Le caratteristiche comuni di tutti i costrutti ingegnerizzati sostitutivi della pelle sono la sicurezza per il paziente, l'adattabilità all'applicazione *in vivo* e l'efficacia clinica. Il sostituto cutaneo ideale è in genere composto da materiale biocompatibile, non deve causare un'eccessiva infiammazione né il rischio di trasmissione di malattie. Il biomateriale per la ricostruzione cutanea deve essere biodegradabile, riparabile e in grado di supportare la ricostruzione dei tessuti normali, con proprietà fisiche e meccaniche simili alla pelle che sostituisce. Dovrebbe fornire sollievo dal dolore, prevenire la perdita di liquidi e calore dalla superficie della ferita, proteggendola dalle infezioni. (Vig K. et al. 2017).

Nessun sostituto cutaneo attualmente in commercio soddisfa pienamente queste caratteristiche né può sostituire completamente le proprietà funzionali e anatomiche della pelle nativa. Tuttavia, viene preferito un modello ad un altro in base alle differenti

caratteristiche e allo scopo principale che si vuole raggiungere (Shakespeare P. G. 2005). In base al lavoro di Shakespeare, sono state evidenziati alcuni principali obiettivi che i prodotti bioingegnerizzati permettono di ottenere:

- formazione di una barriera meccanica di protezione dai microrganismi e controllo della perdita di vapore;
- rapida copertura della ferita prima di una riparazione permanente con innesti cutanei o applicazione di cellule autologhe coltivate, specialmente in ustioni estese;
- presenza di componenti della matrice dermica, citochine e fattori di crescita, che possono promuovere e migliorare le risposte naturali di guarigione della ferita dell'ospite;
- fornitura di collagene dermico o cellule in coltura, che sono incorporate nella ferita e persistono durante la guarigione della ferita.

#### **1.4.2 NASCITA DEI MODELLI SPERIMENTALI CUTANEI**

I primi studi che hanno aperto la via della ricerca verso la formulazione dei costrutti cutanei risalgono al 1871 con Reverdin, che si dedicò allo sviluppo di *graft* per le riepitelizzazione e la guarigione di ferite cutanee superficiali attraverso l'utilizzo di isole epidermiche che, aderendo allo strato granuloso della ferita, ne facilitavano la guarigione. (Kohlhauser M. et al. 2021).

Iniziò così un ampio lavoro di ricerca volto a superare gli ostacoli emersi dal lavoro di Reverdin, tra cui il limite di proliferazione, una guarigione lenta e una ridotta resistenza allo stress. (Ehrenfried A. 1909).

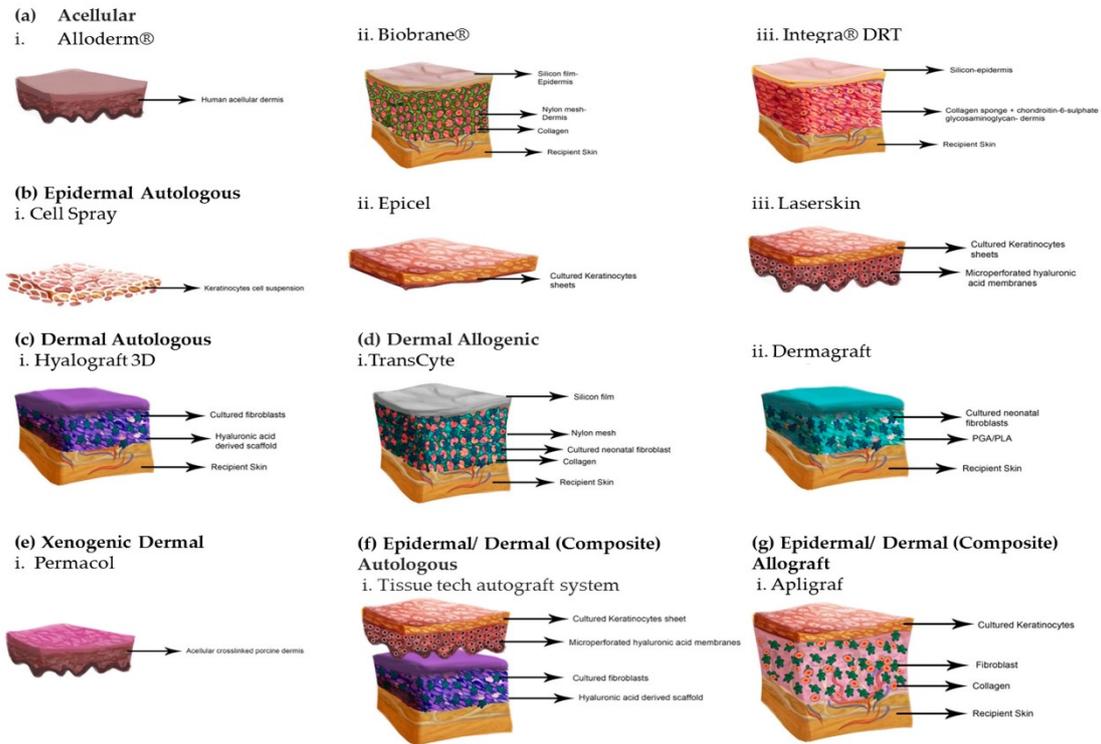
Inizialmente gli studiosi si sono concentrati sull'utilizzo di lembi di cute autologa prelevati dal paziente per indurre il processo di riepitelizzazione di ferite croniche. Nel caso di lesioni ampie e profonde, per esempio ustioni, l'uso di autoinnesti è limitato e per il trapianto vengono utilizzati innesti cutanei allogenici o xenogenici, il cui principale effetto avverso è l'elevato rischio di rigetto e tutte le complicanze che ne conseguono. (Dixit S. et al. 2017). A questo, si aggiungono anche altri effetti svantaggiosi, quali l'insorgenza di dolore, cicatrici, guarigione lenta e infezioni.

Per questi motivi, la ricerca dedicata all'ingegneria tissutale cutanea ha portato al recente sviluppo di modelli tissutali *in vitro* per cercare di superare gli ostacoli relativi all'utilizzo di un innesto cutaneo da pelle nativa. (Alrubaiy L. e Al-Rubaiy K. K. 2009).

Si tratta di innesti cutanei artificiali basati su biomateriali bioingegnerizzati che agiscono come medicazioni bioattive per la cura di ferite, fornendo ossigeno e prevenendo la disidratazione, in modo da favorire la guarigione, escludendo il rischio di infezioni. (Vig K. et al. 2017).

### **1.4.3 CLASSIFICAZIONE DEI MODELLI**

In base alla loro struttura anatomica, i sostituti cutanei artificiali possono essere classificati come equivalenti dermo-epidermici, dermici o epidermici. (Fig. 7).



**Figura 7.** Tipologie di sostituti cutanei ingegnerizzati. (a) Acellulari: i. Karoderm, ii. Biobrane, iii. Integra. (b) Epidermici Autologhi: i. Cell Spray, ii. Epicel, iii. Laserskin. (c) Dermici Autologhi: i. Hyalograft 3D. (d) Dermici Allogenici: i. TransCyte, ii. Dermagraft. (e) Dermici Xenogenici: i. Permacol. (f) Epidermici/Dermici (Compositi) Autologhi: i. Tissue tech Autograft system. (g) Epidermici/Dermici (Compositi) Allograft: i. Apligraf.

(Vig K. et al., 2017)

Uno dei primi sostituti commercializzati è *Integra*®, membrana biodegradabile bilaminare costituita da una matrice di collagene bovino reticolato e glicosamminoglicani che conferisce il supporto e la porosità, ricoperta da una pellicola di gomma siliconica che assicura la funzione epidermica di controllo della disidratazione. La dimensione dei pori è stata progettata per consentire la migrazione delle cellule endoteliali e dei fibroblasti del paziente. Dopo l'applicazione diretta su una ferita, il processo riparativo viene avviato e richiede circa 3-6 settimane per concludersi. Successivamente, lo strato siliconico può essere rimosso e si applica uno strato di epidermide autologa. (Jones I., Currie L., e Martin R. 2002).

Tra i costrutti dermo-epidermici, *Apligraf*<sup>®</sup> è un sostituto cutaneo che promuove la guarigione di ulcere venose e diabetiche. La componente cellulare del costrutto è una co-coltura di cheratinociti epidermici umani e fibroblasti dermici umani attivi in una matrice di collagene bovino di tipo I. L'epidermide presenta uno strato corneo ben differenziato e strati spinosi e granulari ben definiti. I fibroblasti nello strato dermico sono mitoticamente e metabolicamente attivi e secernono collagene e altri componenti della matrice. Il modello risulta privo di alcune cellule normalmente presenti nella cute, inclusi melanociti e mastociti, e alcune strutture cutanee, tra cui nervi, follicoli piliferi, ghiandole sebacee e vasi sanguigni. Inoltre, non è presente membrana basale. (Zaulyanov L. e Kirsner R. S. 2007).

Sono reperibili in commercio sostituti dermici ingegnerizzati.

Tra questi, *Dermagraft*<sup>®</sup> è costituito esclusivamente da fibroblasti dermici neonatali umani, seminati su uno *scaffold* di fibre di un copolimero (acido poli glicolico e acido poli lattico) biorassorbibile, dello spessore di 0,25 mm. I fibroblasti provengono da una banca cellulare qualificata e sono stati ampiamente sottoposti a *screening* per valutare la presenza di agenti infettivi. Durante il processo di produzione, i fibroblasti umani proliferano per riempire gli interstizi dello *scaffold* e secernono collagene, proteine della matrice extracellulare, fattori di crescita e citochine, creando un sostituto dermico tridimensionale di derivazione umana contenente cellule viventi metabolicamente attive. L'uso di cellule non autologhe permette di avere un lembo di tessuto in 3 settimane, riducendo tempi e costi. (Hart C. E., Loewen-Rodriguez A., e Lessem J. 2012).

Anche *Hyalograft*<sup>®</sup> è un sostituto dermico utilizzato in campo clinico. Il modello è costituito da uno *scaffold* tridimensionale di acido ialuronico esterificato, *Hyaff fibers*, su cui sono seminati fibroblasti autologhi. Le cellule trovano l'ambiente ideale per l'adesione, la proliferazione e la produzione di matrice dermica extracellulare. Ha uno spessore di 0,3 mm ed è usato nel trattamento di ulcere croniche e ustioni fino al secondo grado: viene applicato sulla ferita priva di tessuto necrotico, con lo strato di

granulazione che sarà stimolato dall'acido ialuronico dello *scaffold* stesso. (Giuggioli D. et al. 2003)

Sono ampiamente utilizzati anche i sostituti epidermici. Tra questi, *Laserskin*<sup>®</sup> è un *graft* epidermico sottile e trasparente, dedicato al trattamento di ustioni e ulcere croniche. È costituito da una membrana di acido ialuronico esterificato su cui sono seminati cheratinociti autologhi che si infiltrano nei micropori da 0,5 µm di diametro. Sono presenti anche pori da 40 µm di diametro che permettono il drenaggio degli essudati in sede di lesione. (Przekora A. 2020).

Per il progetto di ricerca che vi presento in questo mio lavoro di tesi è stato utilizzato il sostituto epidermico *SkinEthic*<sup>™</sup> di *EpiSkin*<sup>™</sup>.

## **1.5 EPISKIN: SKINETHIC<sup>™</sup>**

Il modello che è stato utilizzato per questo studio è *SkinEthic*<sup>™</sup> RHE, *Reconstructed Human Epidermis*, prodotto dai laboratori dell'azienda francese EPISKIN (Lione, Francia), fondati nel 1992 da Martin Rosdy a Nizza e oggi di proprietà di L'Oréal. L'azienda è *leader* mondiale nell'ingegneria tissutale e produce tessuti umani ricostruiti utilizzati a scopo di ricerca e sviluppo nelle analisi di sicurezza ed efficacia. (Pellevoisin C. et al. 2018).

### **1.5.1 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

*SkinEthic*<sup>™</sup> RHE è un modello di epidermide umana, ricostruita *in vitro* utilizzando cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte in policarbonato all'interfaccia gas-liquido in un mezzo di coltura specifico («SkinEthic RHE Reconstructed Human Epidermis», s.d.).

Il costrutto acquistato per questo studio è stato prodotto con cheratinociti umani isolati da donatori sani, di cui è stata verificata l'assenza di anticorpi contro HIV 1 e 2, contro HPV 1 e 2 e l'assenza di funghi, batteri e micoplasmi.

Le cellule cutanee sono state seminate sullo *scaffold* in policarbonato e successivamente mantenute nel mezzo di coltura per 17 giorni. È garantita e certificata la sterilità di preparazione. Lo spessore è di 0,5 cm<sup>2</sup>. (vedi scheda tecnica del prodotto).

### 1.5.2 MARKERS SPECIFICI

L'azienda garantisce che i cheratinociti che popolano il costrutto esprimano specifici *markers*: di differenziamento, tipici delle giunzioni dermo-epidermiche e di proliferazione. (Tabella 1).

<i>MARKERS DI DIFFERENZIAMENTO</i>	<i>MARKERS DELLE GIUNZIONI DERMO-EPIDERMICHE</i>	<i>MARKERS DI PROLIFERAZIONE</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filaggrina</li> <li>• Involucrina</li> <li>• Loricrina</li> <li>• Transglutaminasi</li> <li>• Keratina 5 e 10</li> <li>• CD44</li> <li>• Ceramidi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Collagene tipo IV</li> <li>• Laminina V</li> <li>• Integrina <math>\alpha 6\beta 4</math></li> <li>• Antigene BP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ki-67</li> <li>• P63</li> <li>• PCNA</li> </ul>

**Tabella 1.** *Elenco dei markers specifici identificabili in SkinEthic™.*

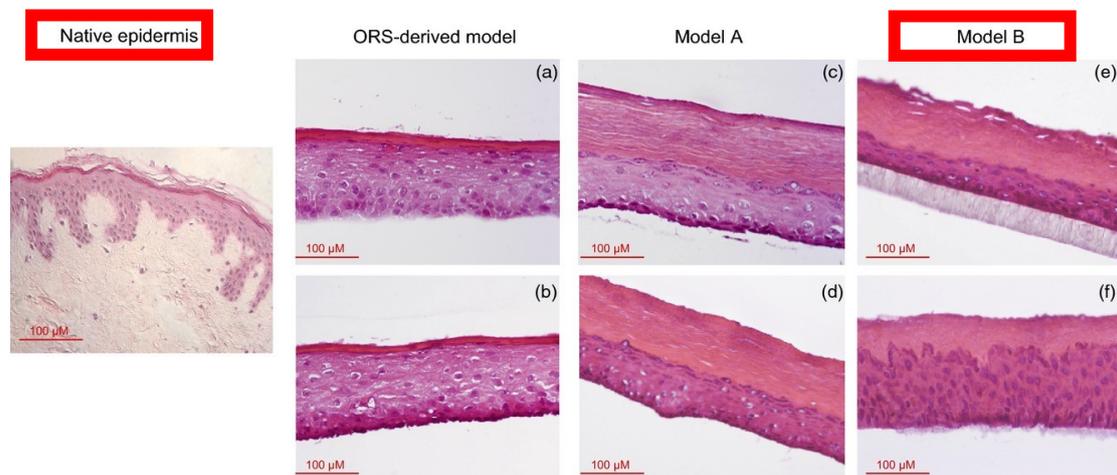
*(SkinEthic RHE Reconstructed Human Epidermis, s.d.)*

### 1.5.3 STUDI DI CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO

Gli studi che sono stati eseguiti sui costrutti *SkinEthic™* dall'azienda produttrice sono numerosi, rappresentati da analisi comparative volte ad evidenziare analogie e differenze tra l'RHE e l'epidermide umana normale.

**ANALISI ISTOLOGICA.** Nello studio di Guiraud del 2014 (Guiraud B. et al. 2014) è stato effettuato un confronto tra la cute nativa e tre differenti campioni: uno ottenuto da cheratinociti della guaina esterna della radice follicolare e due prodotti commerciali di *Episkin*, *EpiSkin™* e *SkinEthic™*.

Dalla comparazione tra la cute e il modello *SkinEthic™* (Model B), è emersa la stessa caratteristica stratificazione epidermica, ma con uno strato corneo più spesso nel costrutto rispetto all'epidermide nativa. Secondo i ricercatori, questo suggerirebbe la possibilità di una maggior velocità di differenziamento dei cheratinociti del modello *SkinEthic™* rispetto alla cute nativa. (Fig. 8).

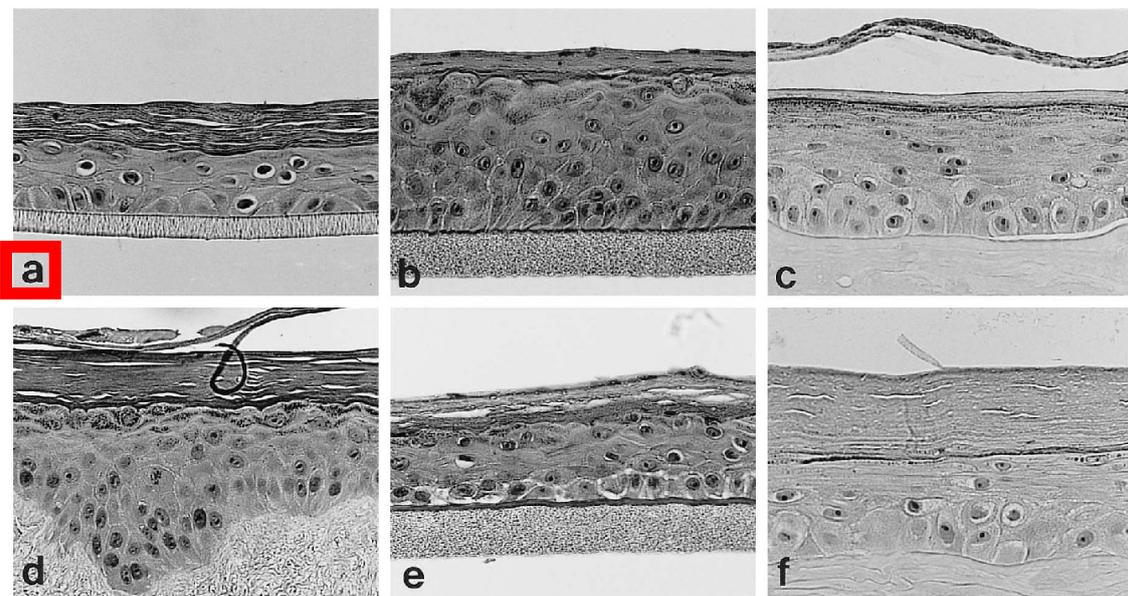


**Figura 8.** Analisi morfologica di epidermide nativa confrontata con modelli derivato da cheratinociti da capsula follicolare (a, b) e costrutti commerciali *EpiSkin™* (Model A: c, d) e *SkinEthic™* (Model B: e, f). Colorazione con ematossilina ed eosina.

(Guiraud B. et al., 2014)

**ANALISI MORFOLOGICA.** Il lavoro di Boelsma del 1999 (Boelsma E., Verhoeven M. H. C., e Ponec M. 1999) è basato su uno studio comparativo fra tre diversi RHE commerciali: *EpiDerm™*, *Episkin™* e *SkinEthic™*. L'analisi ha evidenziato come in ciascun modello sia presente un epitelio pluristratificato molto somigliante alla struttura epidermica nativa.

Si riconosce uno strato basale di cellule cuboidali orientate perpendicolarmente rispetto al filtro in policarbonato; nello strato granuloso, i citoplasmi cellulari sono densi di granuli di cheratoialina e i cheratinociti si appiattiscono avvicinandosi alla superficie apicale del tessuto epiteliale, formando lo strato corneo. In particolare, è stata osservata una discreta variabilità tra costrutti, relativa allo spessore dell'epidermide: il modello *SkinEthic™* presenta un numero inferiore di strati cellulari vitali (5-7) rispetto ai modelli *EpiDerm™* ed *EpiSkin™*. (Fig. 9).

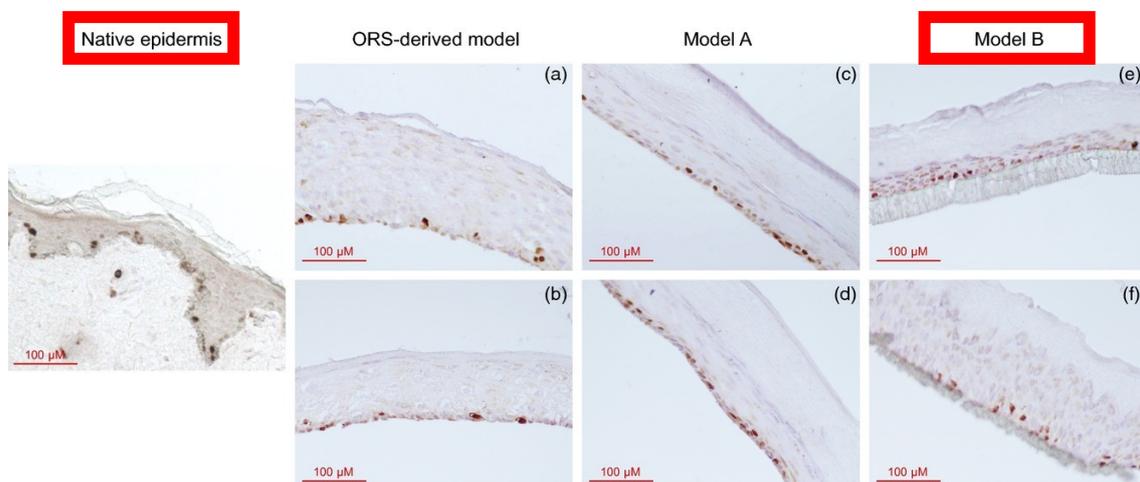


**Figura 9.** Sezioni istologiche dei costrutti analizzati: *SkinEthic™* (a), *EpiDerm™* (b); modello di irritazione *Episkin™* (c); epidermide ricostruita su derma privato di epidermide (d); modello di penetrazione *EpiDerm™* EPI-606A (e); modello di penetrazione *Episkin™* (f).

(Boelsma E. et al., 1999)

**ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE.** Guiraud nel suo studio (Guiraud B. et al. 2014) ha valutato la capacità di rinnovamento tissutale della cute naturale e di diversi modelli di RHE verificando l'espressione di Ki67, *marker* di proliferazione cellulare, attraverso un'analisi immunohistochimica.

È stato dimostrato che sia nella cute nativa che nei sostituti cutanei, la proteina è localizzata nel nucleo delle cellule basali, proliferanti. In particolare, la cute naturale presenta il 12% di cellule Ki67 positive e il modello *SkinEthic*<sup>TM</sup> il 10%. (Fig. 10).



**Figura 10.** Analisi immunohistochimica del marker di proliferazione nucleare Ki67 in epidermide umana nativa, confrontata con campioni rappresentativi di cheratinociti da capsula follicolare (a, b) e costrutti commerciali *EpiSkin*<sup>TM</sup> (Model A: c, d) e *SkinEthic*<sup>TM</sup> (Model B: e, f).

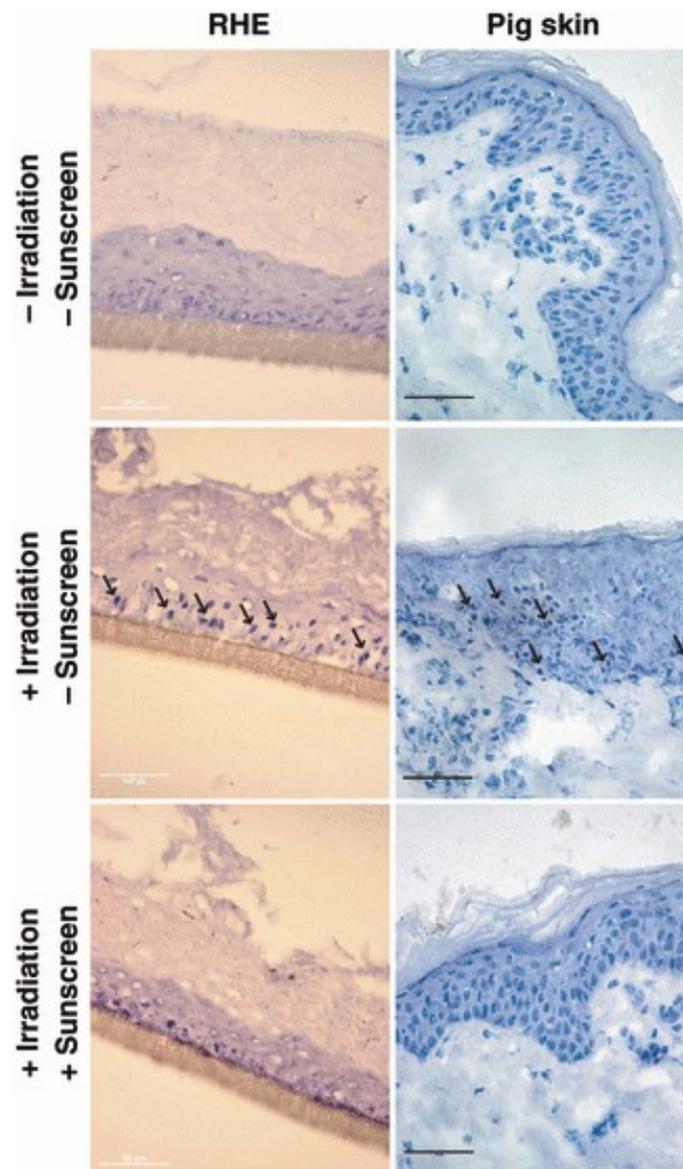
(Guiraud B. et al., 2014)

**ANALISI DI FOTOTOSSICITÀ.** Bacqueville e i suoi collaboratori nel 2009 hanno confrontato gli effetti del danno cellulare indotto da radiazioni solari, sia su cute porcina *ex vivo* che su RHE, utilizzando *SkinEthic™* come modello. (Bacqueville D. e Mavon A. 2009).

Entrambi i campioni sono stati irraggiati con una singola dose di radiazione solare simulata, dell'intensità di  $275 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$  (circa cinque volte la minima intensità che causa eritema); prima dell'esposizione, alcuni campioni sono stati fotoprotetti con un prodotto commerciale UV-bloccante.

Le sezioni sono state sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina e la sola analisi morfologica ha mostrato un aumento dell'apoptosi cellulare, soprattutto nello strato basale di entrambi i campioni privi della soluzione UV-bloccante. Le cellule picnotiche perdono contatto con le cellule adiacenti e assumono una forma rotonda, con un nucleo altamente basofilo a causa dell'elevata condensazione della cromatina.

Le sezioni dei campioni trattati con la fotoprotezione mostrano un minor danneggiamento da radiazione UV, senza compromissione della vitalità delle cellule cutanee. (Fig. 11).



**Figura 11.** Colorazione con ematossilina ed eosina di sezioni di campioni di SkinEthic™ RHE e di cute porcina. Confronto tra tessuti pretrattati con un prodotto UV-bloccante e non, prima dell'irraggiamento con una dose di radiazione solare simulata di 275 kJm-2.

(Bacqueville D. & Mavon A., 2009)

#### **1.5.4 VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'UTILIZZO DI RHE**

I vantaggi di utilizzare modelli di RHE *in vitro* rispetto ai modelli *in vivo* sono da ricondurre alla velocità, semplicità e riproducibilità della loro realizzazione. Possono essere utilizzati per studi di *screening* di composti farmaceutici, fornendo l'ulteriore vantaggio di ridurre la necessità di studi sugli animali. (Danilenko D. M., Phillips G. D. L., e Diaz D. 2016).

Sono numerosi gli studi che hanno analizzato le caratteristiche istologiche dei modelli di RHE, incluse le analisi sulla capacità di proliferazione cellulare e sulla possibilità di studiare gli effetti dell'irritazione cutanea e la fototossicità. La maggior parte dei lavori dimostrano una buona accuratezza e riproducibilità in merito, anche paragonati all'epidermide naturale, con una capacità predittiva intorno al 90%. (Faller C. et al. 2002; Kandárová H. et al. 2006).

I modelli RHE sono costituiti da un unico tipo cellulare, i cheratinociti epidermici, e questo può essere un vantaggio per valutare gli effetti farmaco-tossicologici limitatamente ai cheratinociti, senza alcun contributo da parte di altre componenti cellulari, ma anche limitante negli studi di permeabilità, a causa del maggior ispessimento dello strato corneo rispetto alla cute nativa. (Netzlaff F. et al. 2005).

Inoltre, i modelli di RHE mancano di componenti epidermici come i melanociti e le cellule di Langerhans, così come i leucociti dermici, per cui il loro assetto immunologico è limitato a quello che deriva dai soli cheratinociti. Motivo per cui sono state apportate diverse varianti ai modelli di RHE, nel tentativo di aumentarne il valore predittivo, soprattutto in riferimento agli studi traslazionali pre-clinici. (Schäfer-Korting M. et al. 2008).

Mancano anche componenti dermiche come collagene, fibroblasti e vasi sanguigni. È stato osservato che l'aggiunta di uno strato dermico aumenta la capacità predittiva dei

modelli RHE, sia per gli studi di permeabilità e di trasporto cutaneo che per l'analisi della guarigione delle ferite cutanee. (Semlin L. et al. 2011).

Un'altra variazione specifica è l'aggiunta di melanociti ai cheratinociti epidermici, con l'obiettivo di valutare la biologia dei melanociti cutanei, studiando l'ipo e l'iperpigmentazione. (Passeron T. et al. 2007).

Una terza modifica al modello base sperimentale è l'aggiunta di cellule di Langerhans, creando modelli di RHE per la valutazione della fototossicità e del potenziale di ipersensibilizzazione cutanea da contatto. (Facy V. et al. 2004).

## **1.6 RADIAZIONE IONIZZANTE**

La radiazione ionizzante è una forma di energia emessa da atomi sotto forma di onde elettromagnetiche (raggi  $\gamma$  o raggi X) o particelle elettromagnetiche (neutroni,  $\beta$  o  $\alpha$ ). (Chalkia M. et al. 2022).

L'uomo è costantemente esposto alle radiazioni ionizzanti che derivano da fonti naturali come l'aria, l'acqua o il terreno, poiché nell'ambiente sono naturalmente presenti materiali radioattivi. Inoltre, è possibile entrare in contatto con le radiazioni ionizzanti emesse da fonti artificiali, come nel caso dell'esposizione per diagnosi mediche (radiografie, mammografie, TAC) oppure nel caso di esposizione per beneficiare di un effetto terapeutico, come nella radioterapia, applicata nel trattamento dei tumori. (Chalkia M. et al. 2022).

### **1.6.1 RADIOTERAPIA CONVENZIONALE**

L'effetto antitumorale indotto dalla radiazione deriva sia dalla sua azione diretta di danneggiamento del DNA (30-40% delle lesioni), sia dalla formazione di radicali liberi che a loro volta danneggiano il materiale genetico della cellula tumorale (60-70% delle lesioni). (Ward J. F. 1988).

Nell'uno o nell'altro meccanismo, la radiazione può causare diversi tipi di lesione: depolimerizzazione del DNA, danno alla singola base, *crosslinking*, rotture a singolo o doppio filamento. (Bucher N. e Britten C. D. 2008).

Di conseguenza, la cellula tumorale va incontro a tre destini diversi: può attivare dei *pathways* di riparazione del DNA che, se si compiono correttamente, permettono la sopravvivenza cellulare; il danno al DNA può non essere riparato, con conseguente morte cellulare oppure può verificarsi una riparazione non corretta, che causa l'attivazione del meccanismo di resistenza tumorale alla terapia. (Santivasi W. L. e Xia F. 2014).

In questa tesi si studia una particolare forma di radioterapia: la Terapia per Cattura Neutronica nel Boro, *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT).

### **1.7 TERAPIA PER CATTURA NEUTRONICA NEL BORO**

La terapia di cattura neutronica nel boro, *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT) è un'innovativa modalità di radioterapia contro il cancro, con l'obiettivo di trattare i tumori che difficilmente rispondono alle terapie tradizionali. (Malouff T. D. et al. 2021).

Gli studi preclinici eseguiti sulla BNCT e i trattamenti clinici confermano l'efficacia selettiva della terapia nei confronti delle cellule cancerose, limitando il danno alle cellule del tessuto sano circostante il tumore. (Malouff T. D. et al. 2021)

### **1.7.1 STORIA DELLA BNCT**

Il merito della scoperta dei neutroni è di Chadwick, nel 1932 (Chadwick J. 1932). Ma la BNCT è stata proposta per la prima volta da Locher nel 1936 quando, grazie ai suoi studi, ha potuto affermare il principio di funzionamento della BNCT: se il boro viene assorbito dalle cellule tumorali successivamente esposte ai neutroni termici, tutto il tumore riceve selettivamente una dose maggiore di boro rispetto ai tessuti normali. (Locher G. 1936).

Le prime esperienze cliniche di BNCT si sono svolte tra il 1951 e il 1959 al Brookhaven National Laboratory (BNL; USA) e dal 1956 al Massachusetts Institute of Technology (MIT; USA). Il primo paziente trattato nel 1951 era affetto da un glioma maligno (Miyatake S. I. et al. 2020). 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 nel lavoro di Archambeau (Archambeau J. O. 1970), 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 J. O. 1970; Miyatake S. I. et al. 2020).

Nel 1963, Sweet ha trattato 18 pazienti con BNCT, utilizzando per la prima volta un nuovo veicolante del boro, il disodio-decaidro-decaborato, in grado di veicolare alle cellule una maggior quantità di boro e caratterizzato da bassa tossicità. (Sweet W., Soloway A., e Brownell G. 2009).

Hatanaka ha rilanciato l'applicazione clinica della BNCT in Giappone utilizzando sodio borocaptato, *borocaptate sodium* (BSH), grazie ai nuovi risultati ottenuti e pubblicati nel

lavoro del 1968. L'effetto di accumulo selettivo si otteneva grazie al fatto che il BSH penetrava nel tumore cerebrale infiltrando la barriera ematico encefalica dove questa era distrutta. Inoltre, in questo nuovo trial clinico, l'esposizione del tumore al fascio neutronico avveniva in modalità intracranica, consentendo quindi un irraggiamento più uniforme. Il risultato fu un tasso di sopravvivenza dei pazienti a 5 anni dal trattamento del 58%. (Barth R. F. et al. 2012). Questo risultato ha permesso di riconsiderare la BNCT come opzione terapeutica.

La svolta per la BNCT è stata nel 1987 quando Mishima ha utilizzato la terapia contro un melanoma maligno utilizzando un nuovo farmaco veicolante: la borofenilalanina (BPA), particolarmente adatta per l'accumulo selettivo nel tumore della pelle, per la prima volta estendendo l'applicabilità della BNCT al trattamento dei tumori al di fuori del sistema nervoso centrale (Mishima Y. et al. 1989).

Oltre ai nuovi composti borati, che hanno reso l'efficacia della BNCT più promettente, una innovazione determinante è stata introdotta nella seconda metà degli anni 90: l'uso di fasci neutronici di energia intermedia (epitermici), che aumentavano la penetrazione del fascio, generando un campo di neutroni di bassa energia in corrispondenza del tumore (Chadha M. et al. 1998). Per aumentare ulteriormente il flusso di neutroni in corrispondenza dei tumori profondi, il trattamento è stato ottimizzato con dosi di farmaco borato maggiori e con la rotazione del paziente a metà irraggiamento.

Con il tempo, la BNCT ha trovato un'applicabilità sempre più ampia ma comunque limitata alla disponibilità di reattori che potessero fornire fasci di neutroni di adeguata intensità. (Chadha M. et al. 1998).

La BNCT ha subito una grande evoluzione negli anni, grazie alla ricerca e alle applicazioni cliniche e oggi sono numerosi i gruppi di ricerca che studiano questo ambito. (Nedunchezian K. et al. 2016).

Oggi la BNCT rappresenta un approccio interessante per il trattamento dei tumori che non hanno altre opzioni terapeutiche a causa della loro posizione, dimensione, infiltrazione, disseminazione o resistenza alle terapie farmacologiche. Grazie alla selettività intrinseca della deposizione di energia a carico di prodotti di reazione della BNCT, è possibile trattare i tumori senza la necessità di una precisa conoscenza della loro localizzazione. Questo rende questa terapia potenzialmente utile per trattare le metastasi sparse, ad esempio, quando la chirurgia non è più una possibilità e quando le radioterapie che si basano sulla precisione del fascio di radiazione non sono applicabili. Sono quindi stati condotti trials clinici moderni utilizzando i reattori. Soprattutto in Giappone, Finlandia, Taiwan e Argentina.

Uno studio clinico giapponese condotto da Miyatake ha valutato l'effetto della BNCT nel trattamento del glioma maligno. I risultati hanno evidenziato un significativo prolungamento della sopravvivenza media dopo trattamento con BNCT (9,1 mesi) rispetto a quello (4,4 mesi) dei pazienti che avevano ricevuto altri tipi di terapia dopo la recidiva. (Miyatake S. I. et al. 2018; Satoshi T. et al. 2021).

La BNCT viene utilizzata anche per trattare tumori ricorrenti della testa e del collo in pazienti che hanno subito interventi chirurgici, trattati con chemioterapia e radiazioni fotoniche, in assenza di altre opzioni di trattamento. La risposta alla terapia si è dimostrata positiva dal 61% al 100% dei casi, come riportato da Barth. (Barth R. F., Zhang Z., e Liu T. 2018; Kankaanranta L. et al. 2012).

È stato dimostrato come anche i melanomi cutanei siano tumori maligni trattabili con BNCT. Tra il 2003 e il 2014, in 8 pazienti con melanoma cutaneo sottoposti a BNCT, tutte le lesioni si sono gradualmente attenuate entro un anno e non sono state riportate complicanze, suggerendo che la BNCT potrebbe essere una modalità di trattamento promettente per i melanomi cutanei. (Hiratsuka J. et al. 2020; Menéndez P. R. et al. 2009).

Anche a Pavia alcuni gruppi di lavoro si sono dedicati allo studio della BNCT.

Nel 1987, il Progetto TAOOrMINA (Trattamento Avanzato di Organi Mediante Irraggiamento Neutronico e Autotrapianto) ha portato all'applicazione della BNCT nel trattamento del tumore al fegato: metastasi inoperabili e non responsive di tumore primario al colon. Il fegato è stato perfuso con una soluzione contenente BPA, per circa 2 ore. A 1 ora dall'inizio della somministrazione, sono stati asportati frammenti di fegato e tumorali per misurare l'*uptake* di boro e calibrare il trattamento. Successivamente, il fegato è stato asportato e sottoposto a radiazione con neutroni termici presso il reattore dell'Università di Pavia. L'organo è stato quindi lavato e re-impiantato nel paziente.

Ci sono state alcune complicanze post operatorie ma a 7 mesi dall'operazione il paziente era in buone condizioni, i markers neoplastici erano negativi e la Tomografia a Emissione di Positroni (PET) non evidenziava noduli epatici. (Pinelli T. et al., s.d.).

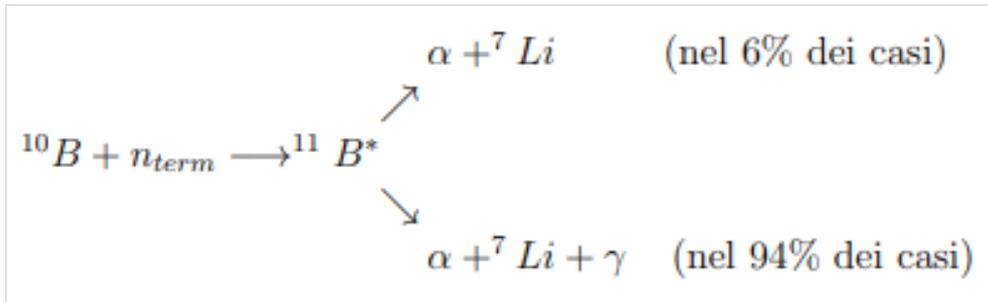
È stato recentemente dimostrato come la BNCT possa essere applicata evitando l'utilizzo del reattore nucleare come sorgente di neutroni. Il lavoro di Hirose del 2021 (Hirose K. et al. 2021) studia il fascio di neutroni ottenuto da acceleratori di protoni nel trattamento di tumori del tratto testa-collo ricorrenti o localmente avanzati. I 18 pazienti, già sottoposti a radioterapia, sono stati trattati con BNCT e hanno dimostrato una sopravvivenza tra il 58% e il 100%. I dati ottenuti sono clinicamente incoraggianti, e rendono possibile l'utilizzo della BNCT anche a quelle strutture che non si possono avvalere di un reattore nucleare. (Hirose K. et al. 2021).

### **1.7.2 PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO**

La BNCT è una radioterapia con approccio binario.

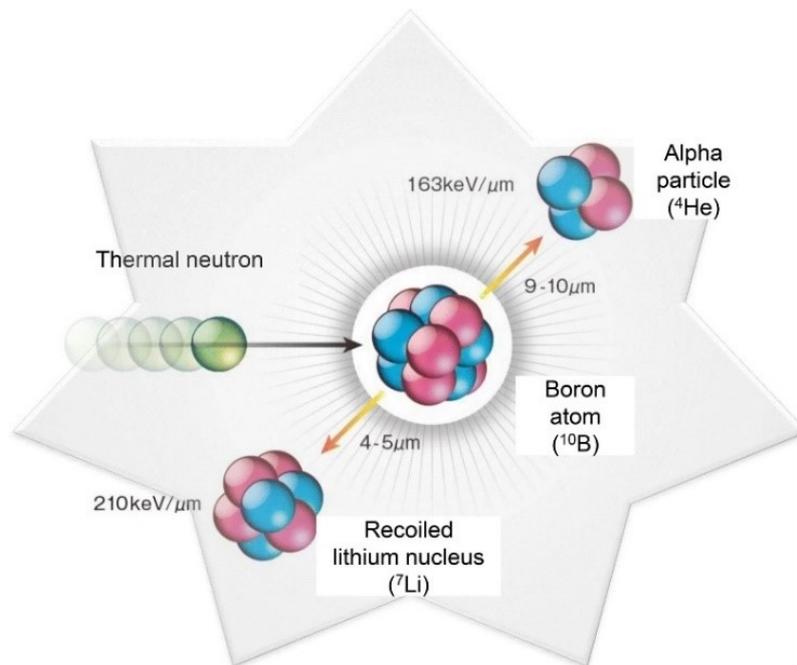
La prima fase prevede la somministrazione di un composto marcato con boro-10 ( $^{10}\text{B}$ ) non radioattivo ad elevata selettività per le cellule tumorali, che lo internalizzano: questo permette che le cellule bersaglio ricevano elevate concentrazioni di  $^{10}\text{B}$  rispetto alle cellule dei tessuti normali circostanti. Segue una seconda fase di irraggiamento con

neutroni a bassa energia, termici per tumori superficiali o epidermici per tumori situati in profondità. (Suzuki M. 2020). Gli atomi di  $^{10}\text{B}$  assorbono i neutroni termici con una probabilità molto più alta rispetto alla probabilità di interazione con gli altri elementi nel tessuto biologico. La reazione nucleare che ne deriva si verifica in due modalità (Fig. 12):



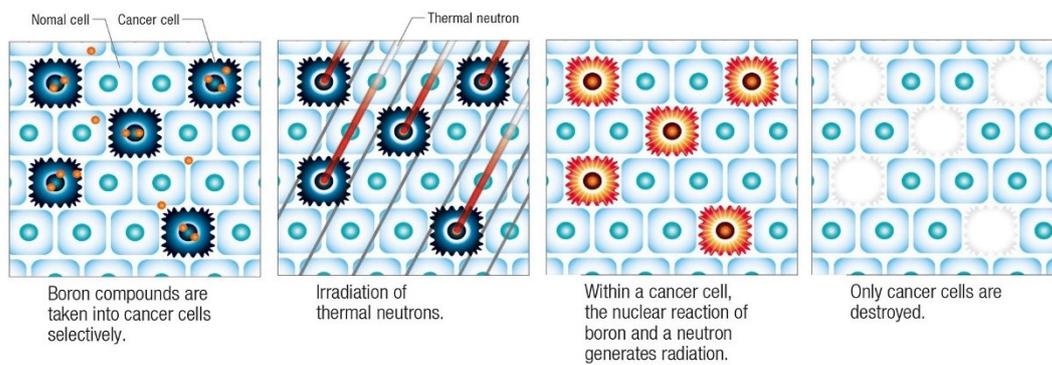
**Figura 12.** Reazioni di cattura neutronica di un neutrone di bassa energia da parte di un nucleo di  $^{10}\text{B}$ .

La reazione genera due particelle cariche ad alto Trasferimento Lineare di Energia (LET): una particella alfa ( $^4\text{He}$ ) e uno ione litio ( $^7\text{Li}$ ). Queste particelle rilasciano la loro energia in una distanza compresa tra i 5 e i 9  $\mu\text{m}$ , approssimativamente il diametro di una cellula (10  $\mu\text{m}$ ). Perciò, se il composto borato si accumula selettivamente nelle cellule tumorali, l'irraggiamento con neutroni termici può causare danni letali alle cellule maligne, preservando le cellule sane circostanti. (Suzuki M. 2020) (Fig. 13 e 14).



**Figura 13.** Schema della reazione di cattura neutronica nel boro.

(Suzuki M., 2020)



**Figura 14.** Uccisione selettiva di cellule tumorali attraverso BNCT.

(Suzuki M., 2020)

### 1.7.3 AGENTI VEICOLANTI

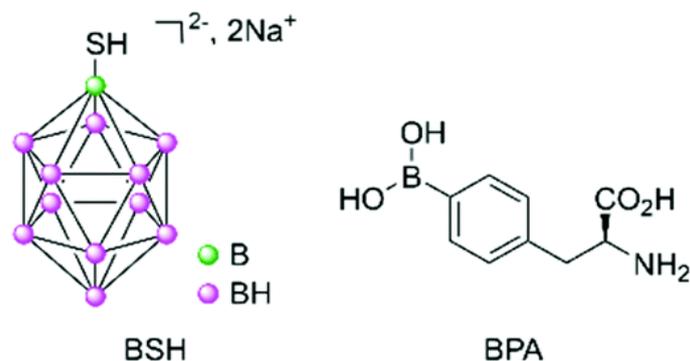
Come anticipato, è intorno agli anni '50 e '60 che i ricercatori hanno individuato agenti veicolanti che hanno determinato un efficace effetto terapeutico con BNCT. (Barth R. F. et al. 2012).

I requisiti più importanti perché un composto sia un buon agente di rilascio utilizzabile in BNCT sono:

- bassa tossicità e minimo assorbimento nel tessuto normale: il rapporto di concentrazione del boro tra tumore vs tessuto normale e tra tumore vs sangue dev'essere circa 3;
- concentrazione tumorale di boro di circa 20 µg per grammo di tumore;
- *clearance* relativamente rapida dal sangue e dai tessuti normali e persistenza nel tumore durante l'irradiazione di neutroni. (Barth R. F. et al. 2012).

I primi composti borati ad essere stati studiati sono alcuni derivati dell'acido borico, per i quali è stata osservata una scarsa selettività e ridotta ritenzione intratumorale, con conseguente tossicità elevata in seguito a irraggiamento neutronico. (Lamba M., Goswami A., e Bandyopadhyay A. 2021).

A seguito degli scarsi esiti clinici dei derivati dell'acido borico, è stata studiata una seconda generazione di composti a basso peso molecolare, e all'inizio degli anni '60 sono stati identificati due agenti borati, il borocaptato di sodio (BSH) e la borofenilalanina (BPA) (Fig. 15). (Barth R. F., Mi P., e Yang W. 2018).



**Figura 15.** Strutture chimiche del borocaptato di sodio (BSH) e della borofenilalanina (BPA).

(Pitto-Barry A., 2021)

Il primo composto ad essere studiato è stato il BSH, assorbito dalle cellule tumorali per diffusione passiva e utilizzato nel trattamento con BNCT dei gliomi ad alto grado (Barth R. F., Mi P., e Yang W. 2018). Il BSH, tuttavia, dimostra una bassa concentrazione di accumulo nelle cellule tumorali, pur essendo interessante per mostrare bassa tossicità sistemica. (Pitto-Barry A. 2021).

BPA viene assorbita dalle cellule tumorali per trasporto attivo, attraverso la proteina LAT1, trasportatore di membrana per gli L-amminoacidi. La sua *over*-espressione in alcuni tipi di tumore, tra cui i melanomi e i gliomi ad alto grado, ne consente l'elevato assorbimento. Il composto ha una buona selettività per le cellule cancerose, per cui è il più utilizzato nel trattamento con BNCT. (Barth R. F. et al. 2012; Barth R. F., Mi P., e Yang W. 2018; Lamba M. , Goswami A., e Bandyopadhyay A. 2021).

Nonostante risultati clinici incoraggianti, la ricerca ha permesso di identificare composti più performanti per rendere la BNCT una modalità terapeutica ancor più applicabile. (Barth R. F., Mi P., e Yang W. 2018).

Si stanno studiando anche agenti veicolanti di terza generazione, con l'obiettivo principale di raggiungere la massima selettività della terapia antitumorale: BSH o BPA

vengono coniugati con molecole mirate al tumore, come peptidi, proteine, nucleosidi, zuccheri, porfirine, anticorpi, liposomi e nanoparticelle per sviluppare un miglior sistema di somministrazione. (Barth R. F., Mi P., e Yang W. 2018).

In alcuni casi, i composti borati sono stati anche incapsulati nel nucleo acquoso dei liposomi che, grazie alla loro componente lipidica, hanno una migliore capacità di attraversare la membrana tumorale e di accumularsi nelle cellule cancerose. (Lamba M., Goswami A., e Bandyopadhyay A. 2021).

#### **1.7.4 MORTE CELLULARE INDOTTA DA BNCT**

Come anticipato, l'internalizzazione del composto borato e il successivo irraggiamento con neutroni, determina la generazione di particelle cariche ad alto LET che, come tutte le radiazioni ionizzanti, causano un grave danno biologico. (Dymova M. A. et al. 2020).

Il bersaglio principale è il DNA, a carico del quale si osservano rotture a singolo e doppio filamento, rottura di una base o dello scheletro zucchero-fosfato; si osservano anche aberrazioni cromosomiche letali come cromosomi dicentrici, cromosomi ad anello, micronuclei e ampie delezioni. Inoltre, sono stati dimostrati effetti indiretti su altre macromolecole: proteine, lipidi e polisaccaridi perdono la loro stabilità e aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). (Dymova M. A. et al. 2020).

Il danno al DNA può attivare due vie alternative: arresto del ciclo cellulare e riparazione del danno oppure apoptosi, *pathways* attivati dall'oncosoppressore p53, a seconda del tipo di alterazione a suo carico. È stato dimostrato che il danno da BNCT può favorire il processo apoptotico o autofagico stimolando il *pathway* di Bcl-2/Bax oppure attraverso la via che porta al danneggiamento dei mitocondri con conseguente rilascio del citocromo C e attivazione delle proteine caspasi. (Dymova M. A. et al. 2020).

### **1.7.5 MISURA DELLA CONCENTRAZIONE DEL BORO: AUTORADIOGRAFIA NEUTRONICA**

Dopo il progetto TAOOrMINA, sono stati numerosi i lavori che si sono concentrati sulla ricerca nell'ambito della BNCT, con l'obiettivo di proporre una applicazione della BNCT più simile a quanto fatto negli altri Paesi, che non richiedesse l'asportazione dell'organo. Si sono studiati vari aspetti interdisciplinari della BNCT, uno di questi è la messa a punto tecniche per quantificare la biodistribuzione del boro nei tessuti e nelle cellule.

L'assorbimento di boro ha un'elevata variabilità intercellulare, a causa delle differenti caratteristiche metaboliche che distinguono i diversi tipi cellulari. Per questo motivo, specialmente nell'utilizzo della BNCT come terapia antitumorale, è indispensabile caratterizzare al meglio la biodistribuzione del boro, per calibrare con massima precisione la dose di radiazione da somministrare al tessuto. Questo può essere fatto con la tecnica dell'autoradiografia neutronica. Questa tecnica 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. (Altieri S. et al. 2008).

A Pavia, si utilizza il rivelatore CR-39, polimero plastico che rileva la presenza di particelle  $\alpha$  nelle cellule che hanno incorporato il boro e che sono state sottoposte a irraggiamento. (Gadan M. A. et al. 2012; Postuma I. et al. 2016).

L'autoradiografia neutronica è una tecnica analitica non distruttiva utilizzata sia per l'imaging della distribuzione di boro nel campione, analisi qualitativa, sia per misurarne la concentrazione e avere quindi un'analisi quantitativa. Il tempo di irraggiamento influenza la densità spaziale delle tracce generate, mentre il tipo di soluzione e il tempo

di sviluppo influenzano il tipo di immagine che si vuole ottenere. (Provenzano L. et al. 2018).

### **1.7.6 EFFETTI DI BNCT SU CUTE UMANA NORMALE**

Un altro ambito di ricerca riguarda il calcolo della distribuzione della dose di radiazione assorbita dal paziente in trattamenti simulati di BNCT, tenendo conto della concentrazione di boro tipicamente ottenuta nel tumore e nei tessuti sani e fasci di neutroni progettati da acceleratori (Postuma I. et al. 2021). In particolare, si simula il piano di trattamento, che stabilisce la posizione del paziente rispetto al fascio (o ai fasci) e il tempo di irraggiamento. In BNCT, si prescrive la dose al tessuto sano più radiosensibile per calcolare la dose nel tumore. La selettività del boro assicura un rapporto di dose tra tessuto tumorale e sano favorevole. In molti casi, il tessuto più radiosensibile che limita il tempo di irraggiamento è la pelle, che inevitabilmente incontra la radiazione prima che questa possa raggiungere i tessuti profondi (Bortolussi S. et al. 2017; Farías R. O. et al. 2014).

La cute normale rappresenta quindi uno dei principali organi a rischio durante un irraggiamento con BNCT. I neutroni epitermici, che termalizzano in profondità nella cute, disperdono circa la metà della loro energia per ogni interazione con i nuclei di atomi idrogeno, uno dei componenti principali dei tessuti biologici. (Fukuda H. 2003). Inoltre, la BPA somministrata come agente veicolante il boro, viene assorbita dalla cute con una concentrazione 1,5 volte superiore a quella del sangue. (Fukuda H. 2003).

La quantità fisica di rilievo in radioterapia è la dose di radiazione, cioè la quantità di energia depositata per unità di massa. Si misura in Grey (Gy): 1 Gy equivale a 1 J/kg. La dose assorbita si correla agli effetti biologici delle radiazioni, e per i fotoni è nota la relazione dose-effetto, grazie a molta esperienza in ricerca e in clinica. Tuttavia, a parità di dose, se la radiazione è di tipo diverso (ad esempio se si tratta di particelle cariche),

gli effetti possono essere molto diversi. Per indicare la dose di particelle cariche in relazione agli effetti biologici prodotti, si usa il Gy-Eq (Grey Equivalente).

Nel 2021, Fukuda (Fukuda H. 2021) ha cercato di determinare la massima dose tollerabile di un singolo irraggiamento di neutroni sulla pelle normale, basandosi sui dati ottenuti da Douglas (Douglas B. G. 1982), il quale ha stimato la massima dose di raggi X tollerabile dalla pelle in funzione della dimensione della zona irraggiata e della quantità di radiazione assorbita. Secondo questo studio, le dosi tollerabili di raggi X sono:

- 17,6 Gy per un campo circolare di 100 cm<sup>2</sup>,
- 18,6 Gy per un campo circolare di 75 cm<sup>2</sup>,
- 17,3 Gy per un campo rettangolare di 6 × 8 cm.

Pertanto, 18 Gy-Eq è il quantitativo adottato da Fukuda come dose massima tollerabile di un singolo irraggiamento sulla pelle.

### **1.7.7 EFFETTO DELLA RADIAZIONE SULL'EPIDERMIDE**

Le lesioni sull'epidermide possono manifestarsi dopo esposizione acuta o cronica a radiazioni ionizzanti, causando alterazioni precoci o ritardate, tipicamente limitate a un'area localizzata del corpo. (Iddins C. J. et al. 2022).

L'intensità, la durata e la gravità delle lesioni seguono uno schema dose-dipendente e possono interessare sia l'epidermide che i tessuti molli sottostanti. (Iddins C. J. et al. 2022).

Le caratteristiche delle lesioni dipendono dal volume di tessuto irraggiato, dalla dose che questo assorbe e dalla qualità della radiazione oltre che dai fattori intrinseci degli individui esposti. (Benderitter M. et al. 2010).

Nel lavoro di Stewart è stato descritto come le lesioni cutanee da radiazione ionizzante abbiano sequenzialità. Infatti, i pazienti possono sviluppare eritema primario o transitorio sulla pelle entro poche ore dall'irradiazione, correlato ai cambiamenti della permeabilità vascolare (Stewart F. A. et al. 2012). Il tempo di comparsa dell'eritema transitorio ha un valore prognostico. Le prime lesioni che si manifestano dopo l'esposizione a radiazioni ionizzanti implicano dosi più elevate assorbite dai tessuti. Di conseguenza, la sua gravità funge da indicatore della dose. («Health Protection Agency. High Dose Radiation Effects and Tissue Injury: Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation» 2009).

Dosi assorbite ridotte sono associate a lesioni transitorie e temporanee; al contrario, dosi assorbite più elevate (>25 Gy) saranno seguite da lesioni più gravi quali necrosi tissutale nelle settimane o nei mesi successivi. (Iddins C. J. et al. 2022).

L'evoluzione di lesioni causate da irraggiamento con dosi di radiazione superiori a 25 Gray (Gy) è stata documentata in diversi incidenti radiologici, e presenta la seguente progressione: eritema transitorio, eritema tardivo seguito da desquamazione secca e umida, lesioni ulcerative e infine necrosi tissutale in un periodo variabile da una a cinque settimane, a seconda delle dosi assorbite (Tabella 2).

MANIFESTAZIONE CUTANEA	DOSE SOGLIA ASSORBITA
Eritema secondario	3 Gy
Epilazione temporanea	3 Gy
Epilazione definitiva	7 Gy
Desquamazione secca	10 Gy
Desquamazione umida	15 Gy
Necrosi	≥ 25 Gy

**Tabella 2.** Dosi soglia per diverse manifestazioni di lesioni da radiazioni locali.

*Modificata da (Iddins C. J. et al. 2022)*

Questa tesi è dedicata a uno studio sperimentale per determinare gli effetti biologici della BNCT sulla cute umana in funzione della dose assorbita. Tale relazione dose-effetto si vuole confrontare con quella dovuta all'irraggiamento con fotoni per determinare la dose equivalente della BNCT ai fotoni. Per questo scopo, si è utilizzato il modello *EPISKIN SkinEthic™*, irraggiato con neutroni (con e senza pretrattamento con boro), e con fotoni.

In particolare, la tesi analizza in dettaglio l'effetto della radiazione sugli aspetti morfologici e proliferativi che possono essere rilevanti ai fini di una futura applicazione clinica della terapia.

## **CAPITOLO 2: STATO DELL'ARTE**

I modelli di epidermide umana ricostruita disponibili in commercio dimostrano elevate analogie con il tessuto umano nativo in termini di morfologia, composizione lipidica e marcatori biochimici.

Questi modelli si sono dimostrati strumenti utili per i test di irritabilità, corrosività e fototossicità, tanto che in alcuni casi possono completamente sostituire i test *in vivo*. (Macfarlane M. et al. 2009).

Il costrutto *SkinEthic™* è molto utilizzato come modello *in vitro* che permette di riprodurre risultati analoghi a quelli che si osservano sull'epidermide umana *in vivo*.

### **2.1 TEST DI IRRITAZIONE CUTANEA**

Nel lavoro di Pellevoisin del 2018 è stato utilizzato il modello *SkinEthic™* per valutare l'irritazione cutanea indotta da agenti chimici (sodio dodecil solfato, acido lattico e acido eptanoico in solventi polari, soluzione di cloruro di sodio, tampone fosfato, solvente non polare e olio di sesamo). Gli effetti sono stati valutati attraverso analisi con test MTT e quantificazione del rilascio di interleuchina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ). (Pellevoisin C. et al. 2018).

I risultati ottenuti con tutti i campioni hanno mostrato analogie con i risultati precedentemente rilevati con i test *in vivo*, confermando la buona applicabilità del modello per i test di irritazione cutanea *in vitro* degli estratti di dispositivi medici.

Il test è stato eseguito in modo analogo da altri sette laboratori che non erano a conoscenza dei dati precedentemente ottenuti e i risultati che sono emersi hanno permesso di confermare l'elevata riproducibilità e l'affidabilità delle analisi.

I test di irritazione cutanea e del potenziale di corrosività di un ingrediente sono necessari per la valutazione della sicurezza dei prodotti cosmetici.

Lo studio di Macfarlane descrive come il test di corrosività su *SkinEthic™* sia ormai sostitutivo del test di Draize su coniglio, in quanto è emersa una buona correlazione tra i dati relativi all'irritazione cutanea *in vivo* e *in vitro*, motivo per cui le valutazioni di sicurezza sui nuovi prodotti possono essere effettuate riducendo o addirittura eliminando i test sugli animali (Macfarlane M. et al. 2009). Il lavoro si conclude affermando che la valutazione del potenziale di irritazione cutanea di nuove sostanze chimiche da utilizzare nei cosmetici può essere effettuato con sicurezza utilizzando solo metodi alternativi ai test sugli animali.

## **2.2 FOTOTOSSICITÀ**

Sono numerosi gli studi di fototossicità applicati ai costrutti *SkinEthic™*.

Nello studio di Bernard (Bernard F. X. et al. 2000), 13 composti fototossici e non fototossici sono stati applicati al modello; dopo esposizione alla radiazione UVA, il modello ha dimostrato la capacità di discriminare tra composti fototossici e non fototossici. Inoltre, il modello è risultato resistente ad alte dosi di radiazione UVA, senza evidenziare alterazioni alla vitalità tissutale.

Jones e i suoi collaboratori (Jones P. A. et al. 2003) hanno messo a punto una strategia per valutare i rischi fototossici da parte di un ingrediente presente all'interno di prodotti che entrano in contatto con la cute umana, grazie al modello *SkinEthic™*. È stata descritta una tecnica a più livelli che prevede la misurazione dello spettro di assorbimento UV/visibile per identificare le lunghezze d'onda che possono dare fototossicità.

Medina (Medina J. et al. 2001) ha testato su *SkinEthic™* il potenziale fototossico di composti fototossici, non fototossici e di prodotti topici. Dopo 24 ore dall'applicazione e sottoponendo alcuni campioni a radiazione UVA, è stata valutata la vitalità cellulare attraverso la quantificazione della lattato-deidrogenasi (LDH) come *marker* di riduzione della vitalità cellulare, l'aumento di espressione di interleuchina 8 (IL-8) come indicatore dell'attività pro-infiammatoria e le caratteristiche morfologiche del costrutto. (Medina J. et al. 2001).

È stato verificato che il modello *SkinEthic™* è in grado di dimostrare la fototossicità di alcuni composti fototossici.

### **2.3 SKINETHIC™ E BNCT**

La mancanza di dati in letteratura relativi agli effetti radiobiologici indotti dalla radiazione per BNCT sulla cute umana normale ha indotto il Gruppo di Ricerca BNCT pavese ad avviare nuovi studi in merito, utilizzando come modello sperimentale il costrutto epidermico *SkinEthic™*.

La tesi di Laurea Magistrale in Fisica della dott.ssa Claretta Guidi, svolta presso il Dipartimento di Fisica dell'Università di Pavia (Guidi 2020), ha considerato l'aspetto dosimetrico e radiobiologico della BNCT, valutando gli effetti della radiazione sia sulla vitalità cellulare dei cheratinociti del costrutto *SkinEthic™* sia sugli aspetti morfologici e strutturali del *graft*, in funzione della dose di radiazione somministrata.

L'obiettivo a lungo termine dello studio è calcolare una dose di radiazione neutronica fotone-equivalente per confrontare gli effetti cutanei della radiazione con BNCT rispetto a quelli della radioterapia convenzionale. È auspicabile riuscire a costruire una curva di probabilità di complicazioni su tessuti normali, *Normal Tissue Complication Probability* (NTCP), identificando la dose di radiazione che apporti il minimo danno cutaneo accettabile a fronte di un effetto terapeutico antitumorale superiore.

Lo studio è stato pianificato in modo che ci fossero 4 gruppi di campioni:

- Esperimenti 1, 2 e 3: 3 gruppi sottoposti a radiazione con neutroni, ognuno dei quali è organizzato in:
  - campioni di controllo, privi di BPA e non irraggiati;
  - campioni privi di BPA e irraggiati;
  - campioni incubati con BPA e irraggiati;
- Esperimento 4: 1 gruppo di campioni sottoposto a radiazione con fotoni, organizzato in:
  - campioni di controllo, non irraggiato;
  - campioni sottoposti a 5 dosi di radiazione crescenti.

Per ogni condizione, i campioni sono stati osservati a quattro tempistiche diverse: T0, T2, T5 e T7, fissando il campione al giorno desiderato o mantenendo i costrutti in terreno di coltura fresco fino al raggiungimento del tempo di osservazione desiderato.

L'azienda produttrice del costrutto, ne garantisce la vitalità in coltura per sette giorni, durante i quali sono stati eseguiti dei test per studiare la vitalità cellulare e il danno tissutale.

La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il saggio MTT, con cui è possibile verificare l'immediato effetto indotto dalla radiazione quantificando le cellule vitali, e quindi calcolando per sottrazione l'eventuale percentuale di cellule morte.

Per valutare il potenziale proliferativo delle cellule, è stato applicato il saggio della Bromodesossipuridina (BrdU), con cui si identificano le cellule che si trovano in fase S del ciclo cellulare, e quindi in attività proliferativa.

I campioni sono stati sottoposti alle procedure di processamento per l'allestimento delle sezioni istologiche da sottoporre a colorazione con Ematossilina ed Eosina (H&E) per

valutare la morfologia dei costrutti e le progressive alterazioni morfologiche; è stato misurato lo spessore totale delle sezioni, lo spessore dello strato corneo e di quello cellulare.

Dai risultati del test MTT e del saggio BrdU è emerso che nei costrutti sono presenti cellule vitali ma danneggiate in modo da non essere più in grado di proliferare, e cellule vitali che conservano la loro attività proliferativa.

È stato possibile capire che dosi di radiazione maggiori causano la riduzione dello strato di tessuto cellulare e la perdita della normale istoarchitettura del tessuto. È emersa una certa variabilità tra i campioni ma è stato possibile concludere che la radiazione influenza sia lo spessore totale del costrutto, sia lo spessore degli strati corneo e cellulare.

## CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO

L'esperienza di internato di tesi presso il laboratorio di Istologia ed Embriologia Generale del Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense mi ha permesso di collaborare con il gruppo di lavoro dell'Università di Pavia che da tempo si occupa di costrutti cutanei irraggiati con radiazione al boro nell'ambito della BNCT. Il Progetto coinvolge il Dipartimento di Fisica, il Dipartimento di Medicina Molecolare e il Laboratorio di Chirurgia Sperimentale.

Questa tesi ha lo scopo di indagare gli effetti radiobiologici dell'irraggiamento con radiazione al boro su campioni di costrutti cutanei di cheratinociti umani: il prodotto *SkinEthic™* dell'azienda *EPISKIN* è utilizzato come modello per capire quali siano gli effetti della radiazione sull'epidermide umana normale, in quanto organo che può limitare il tempo di irraggiamento per diversi trattamenti di BNCT, sia per tumori superficiali (come il melanoma), sia per tumori profondi. Inoltre, si vogliono confrontare gli effetti sull'epidermide indotti da esposizione alla radiazione con fotoni, per contribuire allo studio precedentemente eseguito da Claretta Guidi (Guidi, 2018) e arrivare all'identificazione di una dose fotone-equivalente di BNCT.

La scelta di utilizzare un costrutto epidermico ha l'obiettivo di ridurre il più possibile l'utilizzo dell'animale a scopo di ricerca, secondo la teoria delle 3R (*Reduction, Replacement, Refinement*) e di ottenere un risultato il più possibile comparabile con il tessuto epidermico umano *in vivo*, grazie alla composizione, all'architettura e alla tridimensionalità del modello che rispecchia in modo realistico il comportamento del tessuto nativo, rispetto a una coltura cellulare bidimensionale.

In questo studio, è stata analizzata l'espressione di *markers* di proliferazione e riparazione cellulare espressi dai cheratinociti presenti nel costrutto *SkinEthic™*, confrontando tra loro campioni di controllo di diversi esperimenti e paragonando i campioni di controllo a campioni sottoposti a irraggiamento, sia precedentemente

incubati con l'agente veicolante il boro BPA, sia privi di BPA, per cercare di interpretare l'effetto dell'irraggiamento sul costruito.

La mia esperienza è stata svolta parallelamente a quella condotta del mio collega Francesco Iacullo che con la sua tesi, sempre nell'ambito dello stesso Progetto di Ricerca su BNCT, ha valutato gli effetti dell'irraggiamento su morfologia e istoarchitettura tissutale del costruito *SkinEthic™*.

## **CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI**

Come anticipato, questa tesi sperimentale rappresenta la continuazione del lavoro iniziato con la tesi magistrale di Claretta Guidi (Guidi 2020), che ha condotto un'analisi dosimetrica e uno studio radiobiologico sul costrutto *SkinEthic<sup>TM</sup>* irraggiato con fascio di neutroni.

In questo studio sono stati approfonditi gli aspetti morfologici e proliferativi di campioni sottoposti a irraggiamento con neutroni (con e senza somministrazione di boro) e fotoni.

I campioni sono stati suddivisi in modo da poter svolgere 3 esperimenti con BNCT, a 3 diverse potenze di irraggiamento con neutroni, e un esperimento con irraggiamento a dosi crescenti di fotoni, studiando, per ogni condizione, campioni di controllo (CTR), campioni irraggiati ma privi di BPA (-BPA) e campioni irraggiati dopo incubazione con BPA (+BPA).

Sono state valutate la morfologia e l'istoarchitettura tissutale, la percentuale di cellule proliferanti e la percentuale di cellule esprimenti proteine coinvolte nei meccanismi di riparazione in risposta al trattamento con BNCT.

### **4.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

#### **4.1.1 SCELTA DEL MODELLO: *SKINETHIC<sup>TM</sup>***

Il modello *SkinEthic<sup>TM</sup>* è stato scelto in quanto l'organizzazione degli strati di cheratinociti che lo compongono è comparabile con il tessuto epidermico umano. Il costrutto è fornito dall'azienda produttrice *EpiSkin<sup>TM</sup>* posto in coltura su un supporto inerte in policarbonato di 0,5 cm<sup>2</sup>, all'interfaccia gas-liquido, in un mezzo di coltura definito. Viene inviato a temperatura ambiente in una piastra *multiwell* i cui pozzetti sono riempiti con una soluzione di agarosio che deve essere sostituita con *SkinEthic*

*Maintenance Medium* (SMM) o *SkinEthic Growth Medium* (SGM), fornito insieme al tessuto. Per ogni lotto, l'azienda fornisce una scheda tecnica di controllo qualità che include dati istologici, di vitalità e di sicurezza biologica.

Una volta ricevuto, il campione è stato messo a contatto con SMM per una notte e mantenuto in incubatore prima dell'inizio dei diversi trattamenti.

#### **4.1.2 INCUBAZIONE E ASSORBIMENTO DI BPA**

Prima dell'esposizione del campione alla radiazione, il costrutto è stato incubato con l'agente veicolante BPA per 4 ore. Sono stati studiati campioni con due diversi tempi di incubazione: 4 ore, tempo *standard* di trattamento per le cellule in coltura, e 24 ore, tempo massimo per poter effettuare l'irraggiamento, considerando che la vitalità del costrutto è garantita per 7 giorni. Successivamente, il mezzo di coltura è stato sostituito con un mezzo di mantenimento fresco e i campioni sono stati trasportati al reattore nucleare di ricerca TRIGA Mark II dell'Università di Pavia. Il reattore è equipaggiato con un canale di irraggiamento in cui è presente un campo di neutroni termici. Nella posizione in cui sono stati irraggiati i campioni, il flusso di neutroni è dell'ordine di  $10^{10}$   $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  alla massima potenza del reattore (250 kW).

Per l'uptake di BPA, è stata utilizzata una soluzione acquosa ottenuta miscelando l'isomero L della BPA (arricchita in  $^{10}\text{B}$ ) e un eccesso molare del 10% di fruttosio. Il pH è salito a 9,5-10 con NaOH, la miscela è stata agitata e, dopo alcuni minuti, il pH è stato stabilizzato a 7,4 con HCl. La soluzione è stata aggiunta al terreno di coltura per ottenere la concentrazione di 80 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) di  $^{10}\text{B}$ .

Misurando l'uptake medio di boro dopo 4 ore e dopo 24 ore, risultato rispettivamente  $30 \pm 5$  ppm e  $35 \pm 5$  ppm, è stato scelto di procedere dopo le 4 ore di incubazione.

La quantità di  $^{10}\text{B}$  assorbita dai campioni è stata misurata attraverso la tecnica dell'autoradiografia neutronica. È stato anche osservato che l'uptake di BPA era superiore nelle cellule periferiche rispetto a quelle centrali.

#### 4.1.3 IRRAGGIAMENTO CON NEUTRONI

L'irraggiamento con neutroni è avvenuto nella Colonna Termica del reattore TRIGA Mark II, a differenti potenze di irraggiamento, al fine di sottoporre il campione a dosi di radiazione crescenti. Il valore della dose è stato calcolato con metodo Monte Carlo, tenendo conto della fluenza dei neutroni (determinata dalla potenza del reattore e dal tempo di irraggiamento) e dalla concentrazione del boro misurata in campioni che hanno subito lo stesso trattamento con BPA e che sono stati dedicati solo alla misura (quindi non irraggiati) (Guidi, 2020).

La *multiwell* è stata posta nel reattore e i campioni, con e senza boro, sono stati irraggiati nello stesso momento, ad eccezione dei campioni di controllo che sono stati mantenuti in soluzione tampone, Phosphate Buffer Solution (PBS), e non irraggiati.

Sono stati irraggiati 3 gruppi di campioni (acquistati e trattati in tempi diversi), ognuno dei quali ha assorbito le seguenti dosi: (Tabella 3)

DOSE TOTALE (Gy)	
SOLO NEUTRONI	BNCT
4,5 ± 0,1	35,7 ± 0,5
11,4 ± 0,1	32,5 ± 0,3
22,7 ± 0,3	160 ± 2,0

**Tabella 3.** Dosi di radiazione con neutroni assorbita dai costrutti SkinEthic<sup>TM</sup>.

Modificata da (Guidi 2020)

Subito dopo l'esposizione, tutti i campioni sono stati trasferiti in una nuova piastra *multi-well* contenente terreno di coltura fresco e trasportata ai laboratori di biologia per l'analisi radiobiologica.

I costrutti sono stati osservati a 4 tempistiche diverse: subito dopo l'irraggiamento (T0), dopo due giorni (T2), dopo cinque giorni (T5) e dopo sette giorni (T7). Dopo l'irraggiamento, sono stati fissati al tempo di osservazione desiderato o mantenuti in terreno di coltura fresco, cambiato ogni giorno, fino al suo raggiungimento.

#### **4.1.4 IRRAGGIAMENTO CON FOTONI**

L'irraggiamento con i fotoni è avvenuto presso il Policlinico San Matteo di Pavia, sfruttando le apparecchiature Best-Theratronics (*Raycell® Mk2 X-ray blood irradiator*) comunemente utilizzate per sterilizzare le sacche di sangue per le trasfusioni.

Questo dispositivo è una camera schermata al piombo con due sorgenti di raggi X contrapposte da 160 kV, al centro della quale si trova un cassetto di piombo rimovibile, equidistante dalle sorgenti, dove i campioni vengono irraggiati. Le sacche di sangue vengono posizionate all'interno del cassetto e, dopo un'opportuna calibrazione, la dose di radiazioni viene erogata, per un preciso tempo di irradiazione.

Per l'irraggiamento di geometrie diverse, il cassetto ospita un fantoccio tessuto-equivalente, dotato di un rivelatore posizionato al centro. Tale rivelatore permette di calibrare l'irraggiamento, cioè di fissare il tempo di irraggiamento necessario per ottenere una certa dose assorbita dal campione. Tuttavia, la *multiwell* contenente il costrutto non viene irraggiata nella stessa posizione del rivelatore, ma in una posizione più vicina alla sorgente di fotoni superiore. Inoltre, mentre le sacche di sangue sono sufficientemente grandi da considerare valida la condizione di equilibrio degli elettroni (CE) nel volume irraggiato, nella posizione di irraggiamento della *multiwell* l'equilibrio

potrebbe non essere rispettato. Pertanto, in questi casi l'assunzione di CE può sovrastimare costantemente la dose nei campioni.

Per questo motivo, la validità della condizione CE e le differenze tra il tasso di dose centrale nominale e il tasso di dose assorbita dai campioni di RHE nella posizione di irradiazione, sono stati studiati con la simulazione che ha fornito un fattore di correzione della dose nominale, per ottenere la dose effettivamente assorbita dai campioni (Guidi, 2020).

Alla fine dell'esposizione, sono state calcolate le dosi di radiazioni con fotoni che sono state somministrate (Tabella 4):

<u>Irradiation number</u>	<u>Dose (Gy)</u>
1	$6.0 \pm 0.3$
2	$12.0 \pm 0.6$
3	$24 \pm 1$
4	$36 \pm 2$
5	$108 \pm 5$

**Tabella 4.** Dosi di radiazione con fotoni assorbita dai costrutti SkinEthic™.

(Guidi 2020)

#### 4.1.5 FISSAZIONE, DISIDRATAZIONE, INCLUSIONE E TAGLIO

Dopo la fase di irraggiamento, i costrutti sono stati sottoposti al protocollo di allestimento di un preparato istologico, per poter effettuare le analisi istologiche.

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente inclusi in paraffina.

In seguito, i costrutti sono stati disidratati mediante immersione sequenziale in soluzioni a concentrazioni alcoliche crescenti: soluzione alcolica al 50% per 1 ora, soluzione

alcolica al 70% per 1,5 ore, soluzione alcolica all'80% *overnight*, soluzione alcolica al 95% per 2 ore e in etanolo assoluto per 3 ore.

Successivamente, i campioni sono stati immersi in xilene per 30 minuti, per poi essere depositati in appositi vassoi contenenti paraffina fusa a 48°C per 1 ora e a 58°C *overnight*, con l'accortezza di orientare il campione in modo che, al momento del taglio, le sezioni fossero rappresentative di tutti gli strati cellulari del costrutto.

Il giorno seguente, i vassoi sono stati fatti raffreddare per far solidificare completamente la paraffina e poter staccare il blocchetto dalla struttura di supporto.

Una volta rimossi dal supporto in plastica, i campioni inclusi sono stati sezionati al microtomo, tagliando fette dello spessore di 6 *micron* ( $\mu\text{m}$ ), depositate in un bagnetto di acqua preriscaldata e successivamente raccolte su un vetrino portaoggetto per l'essiccazione.

Le fettine di campione così ottenute sono state sottoposte ad analisi istologiche in seguito a colorazione con ematossilina ed eosina e ad analisi immunoistochimiche per valutare l'incorporazione di BrdU e l'espressione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA).

## **4.2 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA ED EOSINA E MISURAZIONE DELLO SPESSORE DELLE SEZIONI**

In questo studio, le sezioni dei campioni sono state colorate con Ematossilina ed Eosina (H&E) per poter effettuare l'analisi morfologica dei costrutti

La colorazione con H&E è la tecnica più comunemente usata in istologia e negli esami istopatologici di routine.

L'ematossilina è un colorante basico che colora di blu violaceo le molecole acide: nuclei, ribosomi e reticolo endoplasmatico rugoso hanno forte affinità per questo colorante. L'eosina è una molecola acida, che colora le strutture basiche, acidofile, in rosa aranciato. Le proteine citoplasmatiche sono affini all'eosina, per cui i citoplasmi cellulari assumono questa colorazione rosata, con diverse sfumature.

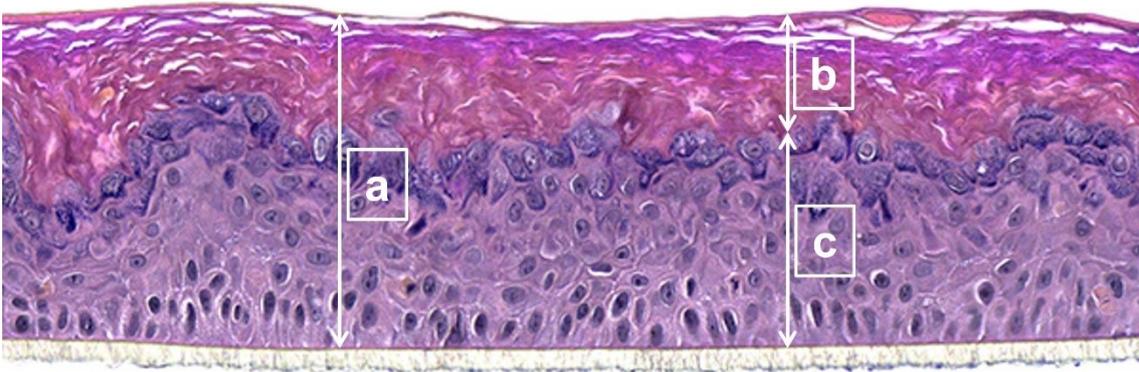
Generalmente, le cellule dei tessuti sottoposti a colorazione con H&E hanno nuclei violacei e citoplasmi rosa o rossi.

I vetrini con le sezioni sono stati caricati su appositi carrelli porta vetrini e sottoposti al seguente protocollo:

- Scala alcolica discendente:
  - Xilene (Honeywell), 2 cicli da 5 minuti in immersione per sciogliere la paraffina;
  - Alcool assoluto (Carlo Erba Reagents), 2 cicli da 5 minuti in immersione,
  - Soluzione alcolica al 96%, 5 minuti in immersione,
  - Soluzione alcolica all'80%, 5 minuti in immersione,
  - Acqua bidistillata, 5 minuti in immersione;
- Ematossilina Mayer (Bio-Optica), 5 minuti in immersione;
- Acqua corrente, 15 minuti. Per permettere il viraggio del colorante, i vetrini sono stati posti sotto acqua corrente, con l'accortezza di non far fluire l'acqua direttamente sulla sezione;
- Eosina (Bio-Optica), 45-60 secondi in immersione
- Scala alcolica ascendente:
  - Soluzione alcolica all'80%, 15-20 secondi in immersione
  - Soluzione alcolica al 96%, 1 minuto in immersione
  - Alcool assoluto, 1 minuto in immersione
  - Xilene, 2 cicli da 5 minuti in immersione

- Montaggio con balsamo DPX (Sigma, *Mountant for Histology*) e vetrino coprioggetto

I campioni sezionati e colorati, sono stati osservati al microscopio a luce trasmessa Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, G) e le relative immagini sono state scattate con la fotocamera digitale Coolpix 950 (Nikon, Japan). Per ogni campione, è stato calcolato lo spessore totale della sezione, lo spessore dello strato corneo e di quello cellulare, utilizzando il programma ImageJ<sup>1</sup>. Per ogni *frame* scattato con ingrandimento 20x, attraverso la funzione “*Straight*” è stato tracciato un segmento lungo quanto la porzione di immagine di interesse (spessore totale, spessore corneo, spessore cellulare) e, attraverso la funzione “*Measure*”, è stata ottenuta la lunghezza del segmento tracciato in *pixels*. (Fig. 16)



**Figura 16.** Sezione di costrutto SkinEthic™ di cui è stato calcolato lo spessore: totale (a), strato corneo (b), strato cellulare (c).

Modificata da (SkinEthic™ RHE Reconstructed Human Epidermis, s.d.)

Sono state eseguite 6 misurazioni per ogni regione di sezione, in doppio; è stato calcolato lo spessore medio e il valore, in *pixels*, è stato convertito in *micron* ( $\mu\text{m}$ ) con

<sup>1</sup> ImageJ è un programma di elaborazione digitale di immagini sviluppato dal *National Institute of Health* degli Stati Uniti

una proporzione. ImageJ fornisce la dimensione del *frame* scattato in *pixels* e, conoscendo le dimensioni del *frame* in  $\mu\text{m}$ , è stato effettuato il seguente calcolo:

$$\text{Spessore sezione } (\mu\text{m}) = \frac{\text{h frame } (\mu\text{m}) * \text{spessore sezione (pixels)}}{\text{h frame (pixels)}}$$

I dati così raccolti sono stati inseriti in tabelle Excel da cui sono stati generati grafici che, unitamente alle immagini scattate, hanno reso possibile l'analisi dei risultati.

### **4.3 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICHE**

Sono state eseguite reazioni immunoistochimiche indirette, in cui l'anticorpo primario che ha legato l'antigene di interesse, viene riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato con una perossidasi, il cui substrato è la diaminobenzidina (DAB), e i cui prodotti di reazione permettono la localizzazione dell'antigene.

#### **4.3.1 SAGGIO DI INCORPORAZIONE DELLA BROMODESOSSIURIDINA (BrdU)**

Il saggio di incorporazione della Bromodesossiuridina, *Bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) consente il rilevamento delle cellule proliferanti presenti nei campioni biologici.

BrdU è un analogo nucleosidico sintetico della timidina, precursore del DNA, composta da timina e dallo zucchero desossiribosio. L'analisi si basa sulla capacità di BrdU di

intercalarsi nella molecola del DNA, a livello del solco maggiore della doppia elica di nuova sintesi delle cellule che si trovano nella fase S del loro ciclo cellulare.

BrdU [10 mM] è stata aggiunta per 2 ore al mezzo di coltura in cui era mantenuto il costrutto, ad eccezione dei campioni irraggiati con radiazione con fotoni, incubati alla concentrazione 50 mM per il medesimo tempo.

BrdU intercalata al DNA è stata rilevata attraverso l'incubazione delle sezioni con l'anticorpo monoclonale primario specifico anti-BrdU, in grado di riconoscerla e legarsi ad essa. L'anticorpo primario è stato a sua volta riconosciuto e legato da un anticorpo secondario e l'avvenuta interazione è stata evidenziata dal trattamento con DAB.

Per questo test, i vetrini sono stati caricati su appositi carrelli porta vetrini e sottoposti al seguente protocollo:

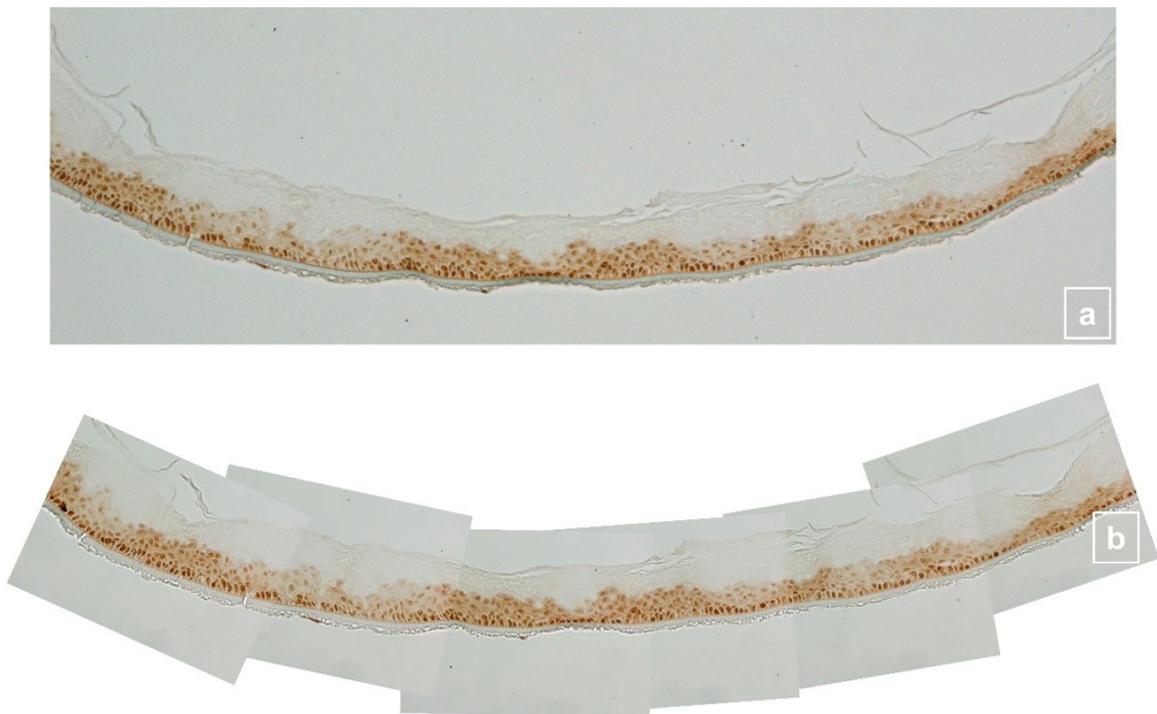
- Scala alcolica discendente:
  - xilene, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - alcool assoluto, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - soluzione alcolica al 96%, 5 minuti in immersione
  - soluzione alcolica all'80%, 5 minuti in immersione
  - soluzione tampone *Tris Buffer Solution*, TBS, 5 minuti
  - acqua bidistillata, 5 minuti in immersione
- Acqua ossigenata, 30 minuti in camera umida
- Lavaggio in TBS, 5 minuti in immersione
- Marginatura
- *Background Sniper*, 15 minuti in camera umida
- Marginatura
- Incubazione con anticorpo primario, 1 ora in camera umida
- Lavaggio in TBS, 3 cicli da 8 minuti in immersione
- Marginatura

- Incubazione con anticorpo secondario (MACH 1 Mouse Probe), 15 minuti in camera umida
- Lavaggio in TBS, 5 minuti in immersione
- Marginatura
- HRP-*Polymer*, 30 minuti in camera umida
- Lavaggio in TBS, 5 minuti in immersione
- Marginatura
- Cromogeno 3,3'-diamminobenzidina (DAB), 4 minuti in camera umida
- Scala alcolica ascendente:
  - acqua bidistillata, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - soluzione alcolica all'80%, 5 minuti in immersione
  - soluzione alcolica al 96%, 5 minuti in immersione
  - alcool assoluto, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - xilene, 2 cicli da 5 minuti in immersione
- Montaggio con balsamo DPX e vetrino coprioggetto

La soluzione tampone TBS è stata preparata partendo da un volume di 4 l di acqua bidistillata, in cui sono stati disciolti 24,22 g di 3-idrossimetil-amminometano (Carlo Erba Reagents) e 17,54 g di cloruro di sodio, NaCl (Sigma-Aldrich), in agitazione. È stato misurato il pH che è stato successivamente regolato a 7.4-7.5 con 14 ml di acido cloridrico, HCl (Carlo Erba Reagents).

Per diluire l'anticorpo primario anti-BrdU (Amersham, GE Healthcare, mouse, Isotype IgG 2 $\alpha$ , Clone BU-1, Product n. RPN202) ad una concentrazione 1:100, è stata preparata una soluzione ricostituendo la nucleasi liofilizzata fornita nel *kit* (DNase-1, RPN20EZ, Lot 17038467) con 4 ml di acqua bidistillata.

*Sniper*, anticorpo secondario, polimero e DAB fanno parte del *kit multilink* MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection, (Bio Care Medical, 110614).



**Figura 17.** Sezione del costrutto SkinEthic™ immunomarcato con anticorpo anti-BrdU. Esempio di ingrandimento 5x (a), costrutto ricostruito con scatti ad ingrandimento 20x (b).

Una volta che il balsamo DPX si è solidificato, le sezioni di ogni costrutto ad ogni condizione sono state osservate al microscopio e fotografate con ingrandimento 5x; in seguito, lo stesso campo è stato fotografato con ingrandimento 20x, scattando immagini in sequenza, per avere una visualizzazione ingrandita della sezione di costrutto ed effettuare dei conteggi con maggior precisione. I frame sono stati trasferiti su pc con cui è stato fatto un lavoro di ricostruzione della sezione ingrandita, sovrapponendo parzialmente le immagini acquisite. (Fig. 17)

In questo modo, è stato possibile contare tutti i nuclei cellulari positivi alla marcatura con anticorpo anti-BrdU. È stata fatta una doppia lettura, in parallelo, dei nuclei positivi ed è stata calcolata la media dei conteggi. In seguito, i valori medi così ottenuti sono stati normalizzati con una proporzione che mette in relazione il numero di cellule positive e l'area della sezione considerata, in *pixels*, calcolata con ImageJ: è stata

selezionata l'area di interesse attraverso il comando di selezione "*Freehand Selection*", escludendo la porzione di supporto del costrutto, e ne è stata calcolata l'area con la funzione "*Measure*".

$$\% \text{ normalizzata di cellule positive} = \frac{\text{numero medio cellule positive} * 100.000}{\text{area sezione (pixels)}}$$

I dati ottenuti sono stati riportati in tabelle Excel da cui sono stati generati grafici per poter interpretare la variazione della positività delle cellule alla marcatura anti-BrdU.

#### **4.3.2 ESPRESSIONE DELL'ANTIGENE NUCLEARE DI PROLIFERAZIONE CELLULARE (PCNA)**

L'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), riconosce le proteine ausiliarie non istoniche della DNA polimerasi, proteine accessorie della polimerasi  $\delta$ , essenziali durante la fase S del ciclo cellulare.

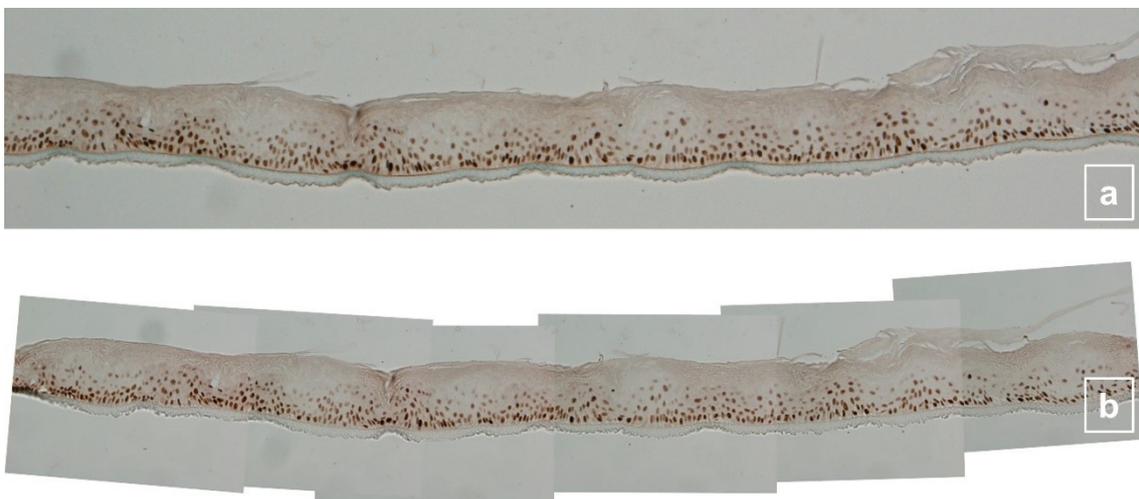
Per valutare l'espressione cellulare di PCNA, è stata effettuata un'analisi immunohistochimica per ogni esperimento.

I vetrini su cui sono presenti le sezioni dei campioni alle diverse condizioni sono stati caricati su appositi carrelli porta vetrini e sottoposti al medesimo protocollo applicato per il saggio per la BrdU (paragrafo 4.3.1).

È stata preparata la soluzione contenente l'anticorpo primario anti-PCNA (Sigma, mouse, Isotype IgG 2 $\alpha$ , Clone PC10, Product n. 8825) con una diluizione 1:150; le sezioni sono state incubate con un volume di soluzione da 100  $\mu$ l per vetrino.

Come per il saggio di incorporazione della BrdU, per la rivelazione della reazione immunostochimica è stato utilizzato il *kit multilink MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection* (Bio Care Medical). Analoga è anche la preparazione della soluzione in cui è stata diluita la DAB, da distribuire su tutti i vetrini di ogni esperimento.

Anche in questo caso, sono state scattate immagini delle sezioni di costrutto ad ingrandimento 5x e lo stesso campo è stato ricostruito con *frame* scattati in sequenza con ingrandimento 20x. Le immagini sono state trasferite su pc con cui è stata ricostruita la sezione ingrandita, sovrapponendo parzialmente le immagini acquisite. (Fig. 18)



**Figura 18.** Sezione del costrutto SkinEthic™ immunomarcato con anticorpo anti-PCNA. Esempio di ingrandimento 5x (a), costrutto ricostruito con scatti ad ingrandimento 20x (b).

Sono stati contati, in doppio, tutti i nuclei positivi alla marcatura, attraverso le immagini scattate con ingrandimento 20x. È stata calcolata la media dei conteggi ad ogni condizione e i valori medi così ottenuti sono stati normalizzati con il medesimo procedimento descritto nel paragrafo 4.3.1.

I dati ottenuti sono stati riportati in tabelle Excel da cui sono stati generati dei grafici per poter interpretare la variazione della positività delle cellule alla marcatura anti-PCNA.

### 4.3.3 ESPRESSIONE DELL'ANTIGENE NUCLEARE Ki-67

La proteina Ki-67 è un antigene nucleare abbondantemente presente nel nucleo delle cellule proliferanti che si trovano in fase S, ed espresso, a concentrazioni minori, anche nel nucleo delle cellule in fase G1, G2 e M del ciclo cellulare. Dopo analisi immunohistochimica su cellule epidermiche, le cellule Ki-67 positive sono sparse nello strato basale e, talvolta, nel successivo strato spinoso.

Per quest'analisi immunohistochimica sono state numerosissime le criticità sperimentali incontrate: su 15 tentativi, anche con protocolli diversi, è stata osservata positività solamente in un caso, che verrà descritto nella discussione dei risultati.

Il protocollo dell'analisi immunohistochimica per Ki-67 prevede:

- Scala alcolica discendente:
  - Xilene, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - Alcool assoluto, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - Soluzione alcolica al 96%, 5 minuti in immersione
  - Soluzione alcolica all'80%, 5 minuti in immersione
  - Soluzione tampone *Tris Buffer Solution*, TBS, 5 minuti
- Pretrattamento in forno a microonde alla massima potenza, con i vetrini immersi in soluzione tampone TBS, in ebollizione per 20 minuti
- Raffreddamento a temperatura ambiente, 20 minuti
- Lavaggio in TBS, 5 minuti in immersione
- Marginatura
- *Background Sniper*, 1 ora in camera umida
- Marginatura
- Lavaggio in TBS, 3 cicli da 5 minuti in immersione
- Incubazione con anticorpo primario, overnight a 4°C
- Lavaggio in TBS, 3 cicli da 5 minuti in immersione
- Marginatura

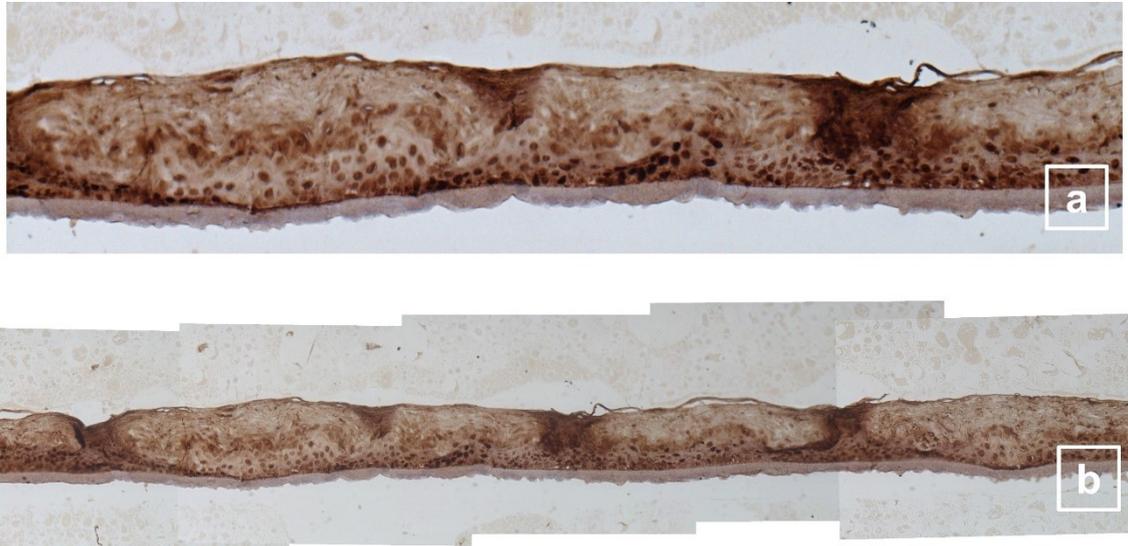
- Incubazione con anticorpo secondario, (MACH 1 Mouse Probe), 1 ora in camera umida
- Lavaggio in TBS, 3 cicli da 5 minuti in immersione
- Marginatura
- HRP-*Polymer*, 30 minuti in camera umida
- Lavaggio in TBS, 3 cicli da 5 minuti in immersione
- Marginatura
- DAB, 4 minuti in camera umida
- Scala alcolica ascendente:
  - Acqua bidistillata, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - Soluzione alcolica all'80%, 5 minuti in immersione
  - Soluzione alcolica al 96%, 5 minuti in immersione
  - Alcool assoluto, 2 cicli da 5 minuti in immersione
  - Xilene, 2 cicli da 5 minuti in immersione
- Montaggio con balsamo DPX e vetrino coprioggetto

È stata preparata la soluzione contenente l'anticorpo primario anti-Ki-67 (Invitrogen, mouse, Isotype IgG 1, Clone 8D5, product n. MA5-15690) con una diluizione 1:200; le sezioni sono state incubate con un volume di soluzione da 100 µl per vetrino.

Per la rivelazione della reazione immunoistochimica è stato utilizzato il *kit multilink* MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection (Bio Care Medical). Analoga alle precedenti reazioni è la preparazione della soluzione in cui è stata diluita la DAB, da distribuire su tutti i vetrini di ogni esperimento.

Le sezioni sottoposte a pretrattamento al microonde risultavano molto danneggiate e qualcuna si è staccata dal vetrino; sono quindi state scattate immagini delle sezioni di costruito ad ingrandimento 10x e lo stesso campo è stato ricostruito con *frame* scattati in sequenza con ingrandimento 20x. Le immagini sono state trasferite su pc con cui è

stata ricostruita la sezione ingrandita, sovrapponendo parzialmente le immagini acquisite. (Fig. 19)



**Figura 19.** Sezione del costrutto SkinEthic™ immunomarcato con anticorpo anti-Ki-67. Esempio di ingrandimento 10x (a), costrutto ricostruito con scatti ad ingrandimento 20x (b).

Sono stati contati, in doppio, tutti i nuclei positivi alla marcatura, attraverso le immagini scattate con ingrandimento 20x. È stata calcolata la media dei conteggi ad ogni condizione e i valori medi così ottenuti sono stati normalizzati con il medesimo procedimento descritto nel paragrafo 4.3.1.

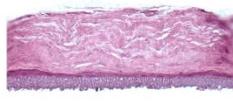
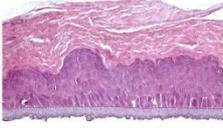
I dati ottenuti sono stati riportati in tabelle Excel da cui sono stati generati dei grafici per poter interpretare la variazione della positività delle cellule alla marcatura anti-Ki67.

## CAPITOLO 5: RISULTATI

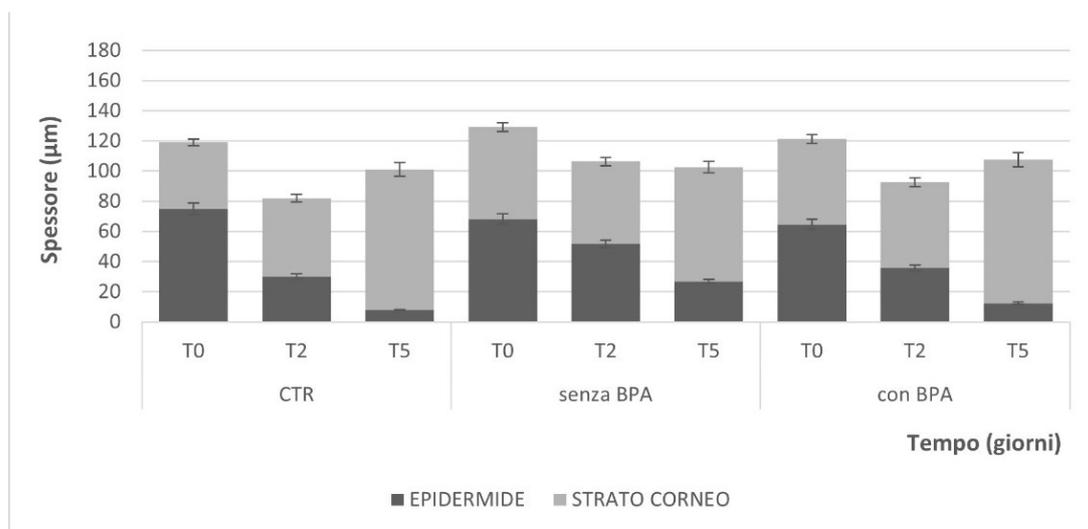
### 5.1 CAMPIONI IRRAGGIATI CON BNCT

#### 5.1.1 ANALISI MORFOLOGICA

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni dei costrutti colorati con H&E, alle diverse condizioni di irraggiamento CTR, -BPA, +BPA, per i diversi tempi T0, T2, T5, T7. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano gli spessori delle sezioni epidermiche (strato cellulare più basofilo e profondo + strato corneo eosinofilo più superficiale) analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. da 20 a 25)

<b>ESPERIMENTO 1 – H&amp;E</b>			
<b>20x</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>
<b>CTR</b>			
<b>- BPA</b>			
<b>+ BPA</b>			

**Figura 20.** Colorazione con Ematossilina (blu, viola) ed Eosina (rosa) delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA), ai tempi T0, T2 e T5, fotografati ad ingrandimento 20x



**Figura 21.** Grafico corrispondente alla misura (in  $\mu\text{m}$ ) dello spessore (strato corneo e strato cellulare) dei campioni di SkinEthic<sup>TM</sup> di Fig. 20, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5).

**T0.** Nel campione controllo (CTR), la componente cellulare presenta uno spessore (75  $\mu\text{m}$ ) quasi doppio rispetto allo strato corneo (44  $\mu\text{m}$ ). I tre strati cellulari, basale, spinoso e granuloso, sono ben distinguibili ed è presente qualche cellula con nucleo picnotico, forse apoptotico, all'interfaccia strato granuloso-strato corneo. È presente qualche minimo spazio otticamente vuoto intorno ai nuclei degli strati intermedi. Nella porzione cheratinizzata, è rilevabile un inizio di sfaldamento nella parte superiore e nella parte mediana.

Il costrutto irraggiato ma non incubato con BPA (- BPA) presenta la componente cellulare epiteliale con spessore simile al controllo (68  $\mu\text{m}$ ), dove i diversi strati sono ancora distinguibili come tali. Lo spessore dello strato corneo è maggiore (61  $\mu\text{m}$ ), determinando un aumento dello spessore totale del costrutto (129  $\mu\text{m}$ ). Sono presenti spazi otticamente vuoti, indice di alterazione morfologica sia nello strato corneo sia nello strato cellulare, seppur in maniera ridotta e solo nello strato basale.

Nel campione incubato con BPA e irraggiato (+ BPA), gli spessori di tutti gli strati sono analoghi al controllo, con minime variazioni. Gli strati cellulari epidermici sono ben distinguibili grazie alla colorazione nucleare basofila che evidenzia i nuclei e quindi la morfologia delle cellule. Anche in questo caso, gli spazi otticamente vuoti sono presenti principalmente nello strato corneo e in minima parte anche nello strato basale.

**T2.** Nel CTR, lo spessore dello strato cellulare è ridotto (30  $\mu\text{m}$ ) e non è distinguibile lo strato basale, in quanto il primo strato di cellule adeso al supporto non ha il caratteristico aspetto con le cellule strettamente affiancate. I nuclei hanno una forma più irregolare e schiacciata, tipica degli strati più superficiali, spinoso e granuloso, che sono ben visibili. Lo strato corneo (52  $\mu\text{m}$ ) è quasi doppio rispetto allo strato cellulare e presenta spazi otticamente vuoti.

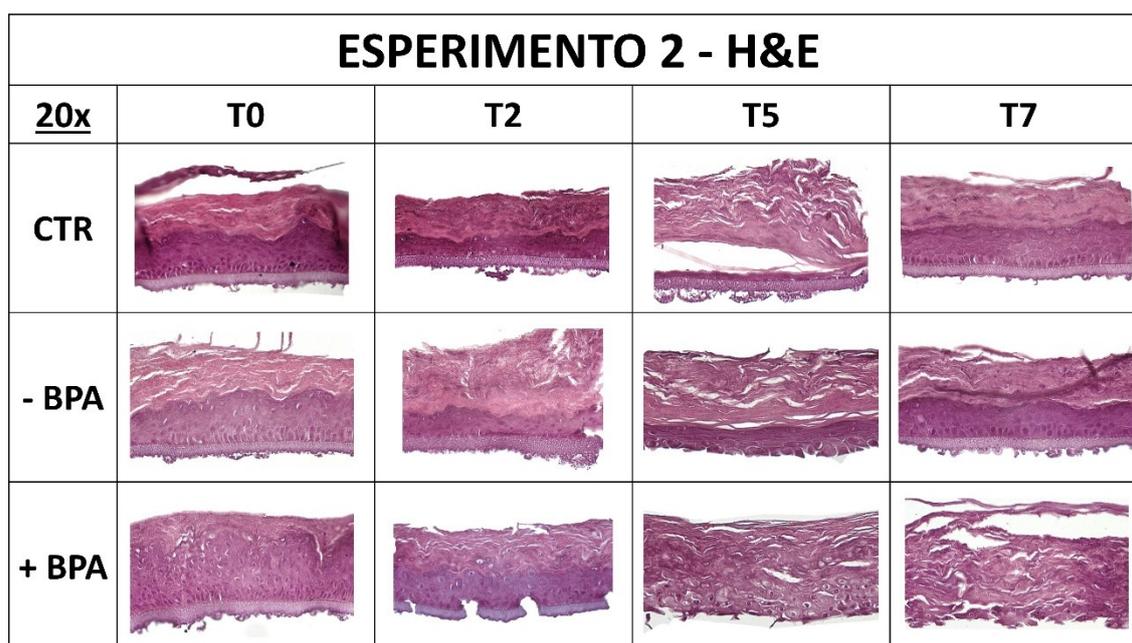
Nel campione - BPA, gli strati cellulari sono ben distinguibili: è presente lo strato basale con le cellule cilindriche strettamente accostate, lo strato spinoso con cellule di forma irregolare e lo strato granuloso con citoplasmici cellulari ricchi di granuli basofili e nuclei picnotici. Lo strato corneo, il cui spessore (54  $\mu\text{m}$ ) è simile alla porzione cellulare sottostante (52  $\mu\text{m}$ ) e al CTR di riferimento, ha una colorazione acidofila e presenta zone chiare, otticamente vuote, più numerose rispetto al CTR e presenti anche nello strato non cheratinizzato.

Nel campione + BPA, non è più identificabile lo strato basale ma solo lo strato spinoso e granuloso. Lo spessore è analogo a quello dei costrutti di controllo: sia la componente cellulare non cheratinizzata (35  $\mu\text{m}$ ) sia lo strato corneo (56  $\mu\text{m}$ ) hanno dimensioni simili. Sono presenti spazi otticamente vuoti esclusivamente nello strato corneo.

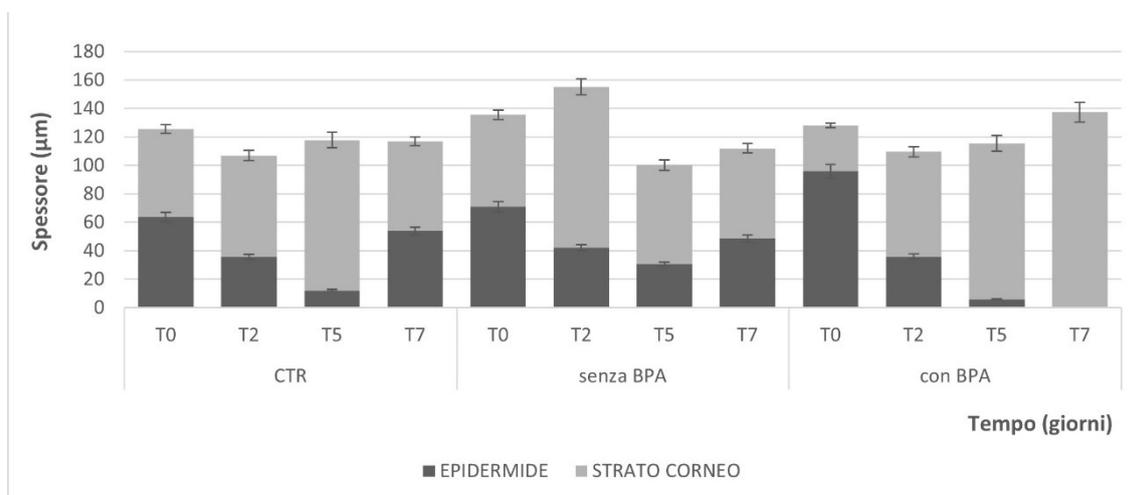
**T5.** Nel CTR, lo spessore della componente cellulare è molto ridotto (8  $\mu\text{m}$ ): sono presenti solo uno o due strati di cellule i cui nuclei sono molto appiattiti. Lo strato corneo ha uno spessore abbondante (93  $\mu\text{m}$ ) ed è possibile osservare chiaramente gli spazi otticamente vuoti.

Nel costrutto - BPA, la componente epidermica è sottile (27  $\mu\text{m}$ ) e formata da 4 o 5 strati di cellule; lo strato più superficiale, a contatto con lo strato corneo, presenta cellule dall'aspetto apoptotico. Sono presenti piccoli spazi otticamente vuoti, maggiormente evidenti nello strato cheratinizzato, che presenta uno spessore (76  $\mu\text{m}$ ) di poco inferiore al costrutto di controllo.

Il campione + BPA e irraggiato ha perso il supporto su cui poggiano le cellule in coltura. Non è più possibile riconoscere i diversi strati epidermici ma la componente non cheratinizzata è composta da uno o due strati di cellule vitali e quattro o cinque strati di cellule dal nucleo picnotico. Nello strato corneo, il cui spessore (95  $\mu\text{m}$ ) è analogo al costrutto considerato come CTR, è possibile osservare spazi otticamente vuoti, che sono presenti in tutti tre i campioni.



**Figura 22.** Colorazione con Ematossilina (blu, viola) ed Eosina (rosa) delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA), ai tempi T0, T2, T5 e T7, fotografati ad ingrandimento 20x



**Figura 23** Grafico corrispondente alla misura (in  $\mu\text{m}$ ) dello spessore (strato corneo e strato cellulare) dei campioni di SkinEthic<sup>TM</sup> di Fig. 22, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Il costrutto epidermico CTR presenta uno strato cellulare ( $64 \mu\text{m}$ ) spesso quanto quello cheratinizzato ( $62 \mu\text{m}$ ). Osservando i nuclei basofili è possibile distinguere lo strato basale, in cui le cellule hanno una forma cilindrica e sono strettamente accostate, da quello spinoso in cui le cellule assumono una forma più irregolare e l'architettura è meno ordinata. È possibile distinguere anche lo strato granuloso, a contatto con lo strato corneo, le cui cellule hanno un citoplasma ricco di granuli altamente basofili. Lo strato corneo presenta maggiore acidofilia dovuta al ricco contenuto in cheratina nelle cellule ormai in fase di citomorfosi cornea.

Nel campione senza BPA, sono ancora visibili tutti gli strati epidermici, ma, diversamente dal controllo, negli strati intermedi è possibile osservare alcune cellule in una fase morfologicamente alterata (con nucleo picnotico e citoplasma otticamente vuoto), segno di un inizio di degradazione. Lo strato corneo ( $64 \mu\text{m}$ ) è meno spesso rispetto alla parte cellulare ( $71 \mu\text{m}$ ) ed è ampio quanto lo strato corneificato del controllo.

Nel campione con BPA, lo strato cellulare ha un elevato spessore (95  $\mu\text{m}$ ), maggiore rispetto al controllo, e i segni di rottura del costrutto sono più evidenti nella porzione intermedia; lo strato corneo è integro e sottile (32  $\mu\text{m}$ ).

**T2.** Nel campione CTR, la componente cellulare ha uno spessore ridotto (36  $\mu\text{m}$ ) rispetto al corrispettivo al tempo T0 e in ogni strato sono presenti cellule con citoplasma chiaro, otticamente vuoto. Gli strati epidermici sono distinguibili osservando i nuclei basofili e il loro allineamento. Lo strato corneo è abbondante (71  $\mu\text{m}$ ) e integro. L'istioarchitettura del costrutto è mantenuta e gli strati sono completi.

Il costrutto privo di BPA, presenta uno strato cellulare sottile (42  $\mu\text{m}$ ) ma è ancora possibile identificare le diverse file cellulari. Lo strato corneo è abbondante (112  $\mu\text{m}$ ) e quantitativamente superiore rispetto al controllo; si osservano spazi otticamente vuoti nello strato corneo, indice di sfaldamento.

Nel campione con BPA sono distinguibili gli strati cellulari, con uno spessore totale (110  $\mu\text{m}$ ) analogo al controllo. Si osserva tuttavia un inizio di sfaldamento nello strato corneo, assottigliato (74  $\mu\text{m}$ ) rispetto al controllo e al campione non incubato con BPA.

**T5.** Il CTR presenta lo spessore della componente cellulare estremamente sottile (12  $\mu\text{m}$ ), composto da una o due file di cellule. È evidente una degradazione dello strato corneo che risulta frammentato e distaccato dallo strato epidermico.

Il campione senza BPA ha uno strato cellulare più spesso (70  $\mu\text{m}$ ) in cui è possibile distinguere lo strato spinoso e granuloso grazie all'aspetto rispettivamente poliedrico e appiattito delle cellule che li compongono. Non sono evidenti segni di degradazione ma non è più presente il supporto in policarbonato. Nello strato corneo, il livello di degradazione è elevato, con numerose lamine di cheratina sfaldate e spazi otticamente vuoti presenti in tutta la sezione.

Nel campione con BPA, i nuclei sono altamente basofili e picnotici e le cellule sono quasi totalmente a morfologia apoptotica, con nucleo picnotico, fatta eccezione per il

monostrato basale nella parte inferiore, a contatto con il supporto (non-presente in sezione). L'acidofilia dello strato corneo è poco intensa ed è evidente la degradazione superficiale.

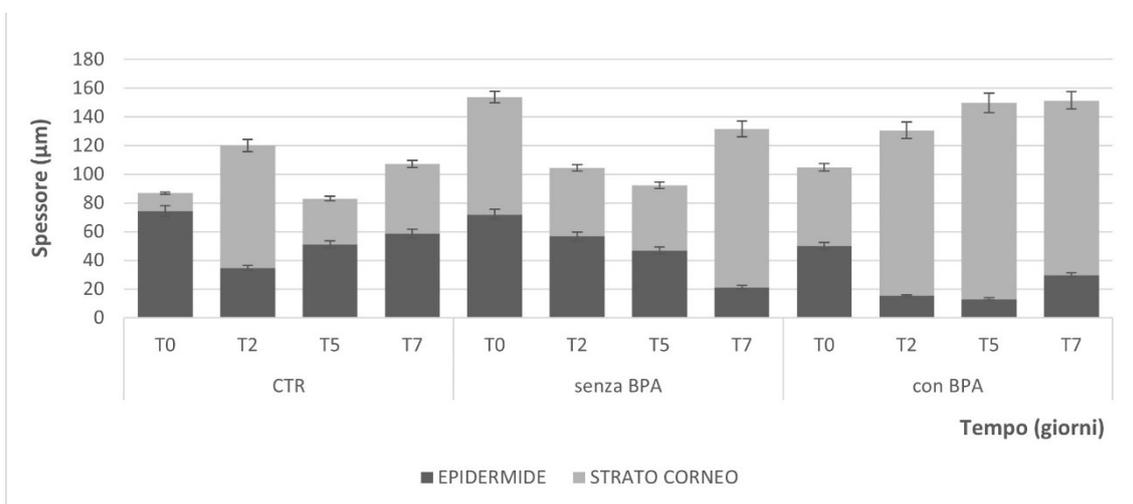
**T7.** Il CTR presenta una perfetta integrità morfologica, con gli strati basale, spinoso e granuloso ben conservati. Lo strato corneo (63  $\mu\text{m}$ ) ha uno spessore simile a quello dello strato cellulare (54  $\mu\text{m}$ ). Non sono presenti segni di degradazione.

Il campione privo di BPA presenta uno strato non cheratinizzato di spessore simile al controllo (48  $\mu\text{m}$ ) e in cui gli strati cellulari sono ben definiti. Lo spessore dello strato corneo (63  $\mu\text{m}$ ) e quello dello strato cellulare sono simili al controllo. Sono presenti spazi otticamente vuoti, ad indicare sfaldamento, solo nello strato corneo.

Il costrutto con BPA mostra una degradazione totale: la componente cellulare è quasi totalmente assente e le uniche cellule presenti hanno un nucleo apoptotico. Lo strato corneo occupa tutto lo spessore del costrutto (137  $\mu\text{m}$ ) e non è più possibile apprezzarne l'acidofilia.



**Figura 24.** Colorazione con Ematossilina (blu, viola) ed Eosina (rosa) delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA), ai tempi T0, T2, T5 e T7, fotografati ad ingrandimento 20x



**Figura 25.** Grafico corrispondente alla misura (in µm) dello spessore (strato corneo e strato cellulare) dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 24, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Nel CTR è possibile apprezzare tutti gli strati epidermici e le loro tipiche caratteristiche morfologiche: cellule cilindriche e strettamente accostate nello strato basale, cellule dalla forma prismatica nello strato spinoso e cellule con citoplasma ricco di granuli basofili nello strato granuloso. Per ognuno di questi strati, sono presenti due o tre file di cellule. Alcune cellule degli strati intermedi presentano degli aloni chiari otticamente vuoti nelle porzioni perinucleari, la parte epidermica è spessa (74  $\mu\text{m}$ ) e lo strato corneo è molto sottile (12  $\mu\text{m}$ ), intenso ed acidofilo.

Nel campione senza BPA, è ancora possibile identificare i 3 strati epidermici, con cellule dai nuclei altamente basofili. È possibile notare spazi otticamente vuoti presenti nella zona perinucleare. Lo strato corneo, acidofilo, è in fase di sfaldamento ed è possibile riconoscere la presenza di ampi spazi otticamente vuoti. Rispetto al controllo, in cui lo strato corneo è molto sottile, in questo campione gli spessori dei due strati sono quasi equivalenti (72  $\mu\text{m}$  vs 81  $\mu\text{m}$ ).

Nel campione con BPA, la colorazione dello strato epidermico è altamente basofila ed è difficile distinguere gli strati epidermici. Lo strato corneo è acidofilo con ridotta presenza di spazi otticamente vuoti. La sezione ha uno spessore complessivo (105  $\mu\text{m}$ ) inferiore al CTR ma le due componenti, strato cellulare e strato corneo, sono simili (50  $\mu\text{m}$  vs 55  $\mu\text{m}$ ).

**T2.** Nel CTR, non è possibile apprezzare la diversa morfologia dei tre strati epidermici ma i nuclei delle cellule più a contatto con il supporto hanno una colorazione altamente basofila rispetto ai nuclei degli strati intermedi. Sono presenti minimi spazi otticamente vuoti. Nello strato cheratinizzato, si riconoscono spazi otticamente vuoti e lo spessore (85  $\mu\text{m}$ ) è doppio rispetto alla porzione cellulare (35  $\mu\text{m}$ ).

Nel campione senza BPA, è possibile distinguere gli strati non cheratinizzati con la loro morfologia caratteristica. Intorno ad alcune cellule sono presenti spazi otticamente vuoti. Lo strato corneo ha uno spessore (48  $\mu\text{m}$ ) analogo allo strato non cheratinizzato (57  $\mu\text{m}$ ) e presenta ampi spazi otticamente vuoti. Rispetto al controllo, lo spessore totale della sezione è minore (105  $\mu\text{m}$ ).

Nel costrutto irraggiato dopo incubazione con BPA, è ancora possibile riconoscere i tre strati epidermici non cheratinizzati: lo strato basale presenta cellule accostate tra loro, dalla forma irregolare; lo strato spinoso è composto da una o due file di cellule di forma irregolare; anche nello strato granuloso è possibile osservare la presenza di un doppio strato di cellule con il citoplasma ricco in granuli altamente basofili. La componente cornea è intensamente acidofila, sono presenti spazi otticamente vuoti come nella sezione di controllo e nel campione non incubato con BPA. L'aspetto generale della sezione è simile al campione di controllo, con uno strato corneo (121  $\mu\text{m}$ ) più spesso rispetto alla parte cellulare dell'epidermide (30  $\mu\text{m}$ ).

**T5.** Nel campione di controllo è possibile apprezzare con chiarezza tutti i tre strati epidermici. La porzione cornea ha uno spessore inferiore rispetto alla parte cellulare, da cui si sta desquamando.

Il campione non incubato con BPA ha un aspetto analogo al controllo, con gli strati cellulari che si distinguono con chiarezza. La parte cheratinizzata è adesa all'epidermide e presenta spazi otticamente vuoti. Gli spessori delle due porzioni sono analoghi tra loro (47  $\mu\text{m}$  vs 45  $\mu\text{m}$ ) e la componente epidermica ha uno spessore simile a quella di controllo.

La sezione di campione con BPA presenta un elevato livello di degradazione: la regione epidermica è ridotta a 5-6 strati di cellule di cui non è più possibile distinguere gli aspetti morfologici e alcune cellule presentano un nucleo picnotico. La porzione cheratinizzata occupa quasi tutto lo spessore della sezione (137  $\mu\text{m}$ ), che è visibilmente superiore rispetto al controllo e in cui si osservano abbondanti spazi otticamente vuoti.

**T7.** Il campione di controllo tenuto in coltura per 7 giorni, presenta degli strati cellulari in cui la morfologia è relativamente mantenuta. Infatti, lo strato basale presenta delle cellule di forma regolare e accostate, lo strato spinoso ha nuclei meno basofili e cellule di forma più irregolare e lo strato granuloso presenta cellule appiattite e con citoplasma ricco in granuli basofili. Il distacco dello strato corneo è evidente ma gli spazi otticamente

vuoti sono poco presenti. Lo spessore della parte cheratinizzata (48  $\mu\text{m}$ ) è di poco inferiore rispetto alla componente epidermica (59  $\mu\text{m}$ ).

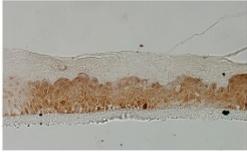
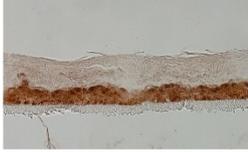
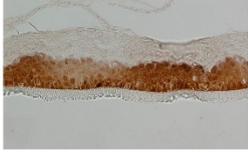
Nel campione privo di BPA non è possibile riconoscere la morfologia degli strati epidermici e difficilmente si identificano le cellule che li compongono. Lo strato corneo presenta una discreta acidofilia, è distaccato dalla porzione epidermica e al suo interno si possono osservare spazi otticamente vuoti. Il suo spessore (110  $\mu\text{m}$ ) è superiore rispetto alla porzione non cheratinizzata (21  $\mu\text{m}$ ).

Nel campione con BPA, è possibile osservare come i nuclei della zona epidermica siano per la maggior parte picnotici; l'integrità morfologica delle cellule è mantenuta solo per 2 o 3 strati profondi, il cui nucleo ha una colorazione basofila e una forma appiattita. La parte cornea è abbondante (121  $\mu\text{m}$ ) e al suo interno si possono osservare ampi spazi otticamente vuoti. Lo spessore totale della sezione (151  $\mu\text{m}$ ) è maggiore rispetto a quella di controllo (107  $\mu\text{m}$ ), con una parte cheratinizzata maggiore rispetto alla zona epidermica (30  $\mu\text{m}$ ).

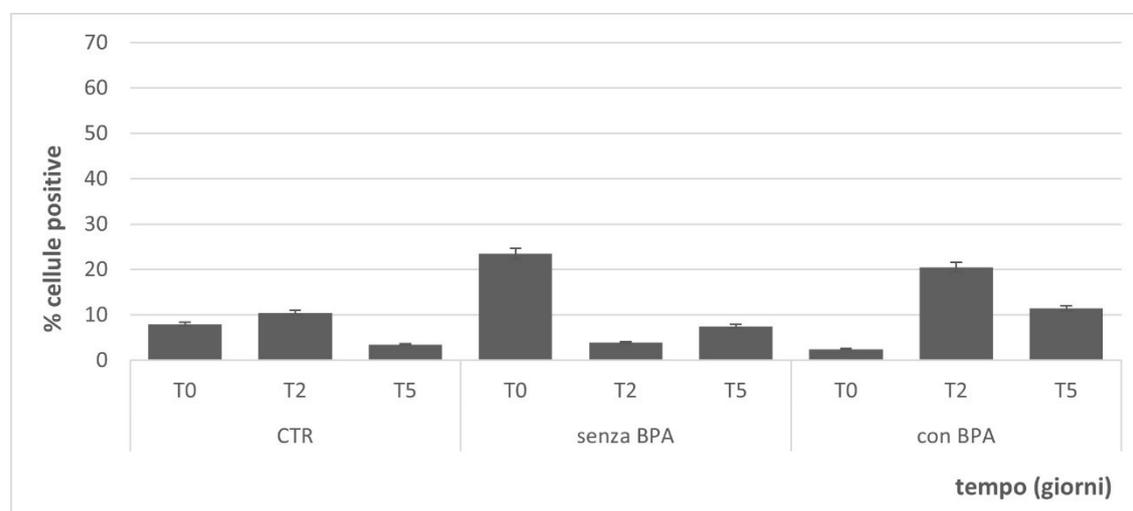
## **5.1.2 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA**

### **VALUTAZIONE DELL'INCORPORAZIONE DI BrdU**

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni dei costrutti immunomarcati con anticorpo anti BrdU, alle diverse condizioni. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano l'andamento della positività delle cellule delle sezioni analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. da 26 a 31)

ESPERIMENTO 1 - BrdU			
20x	T0	T2	T5
CTR			
- BPA			
+ BPA			

**Figura 26.** Immunomarcatura anti-BrdU delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2 e T5. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di BrdU. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.

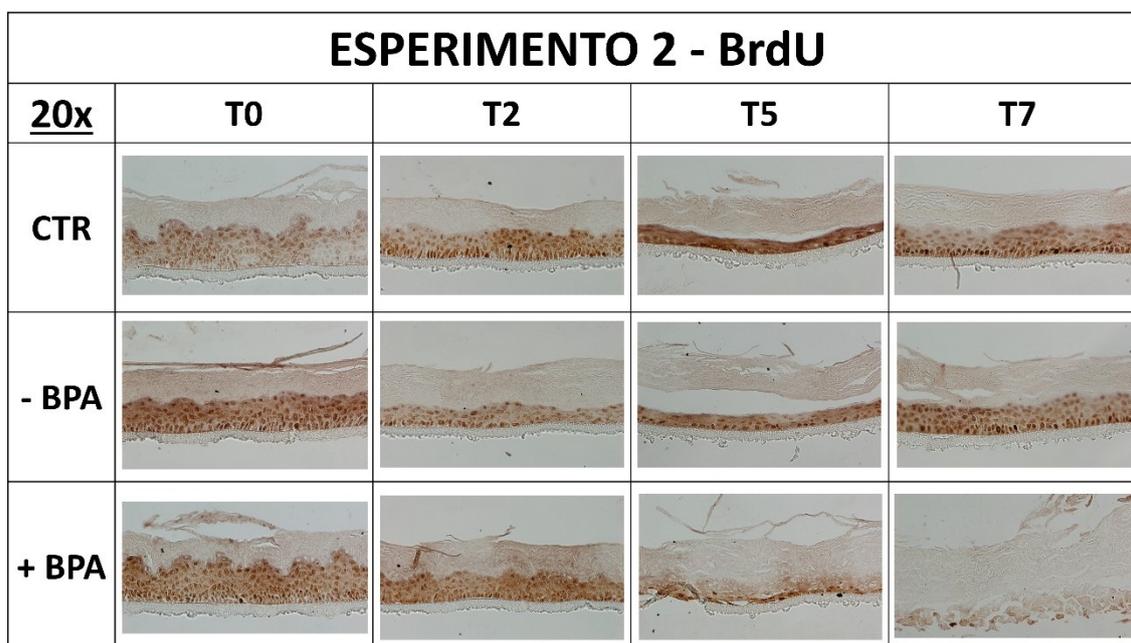


**Figura 27.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 26, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5).

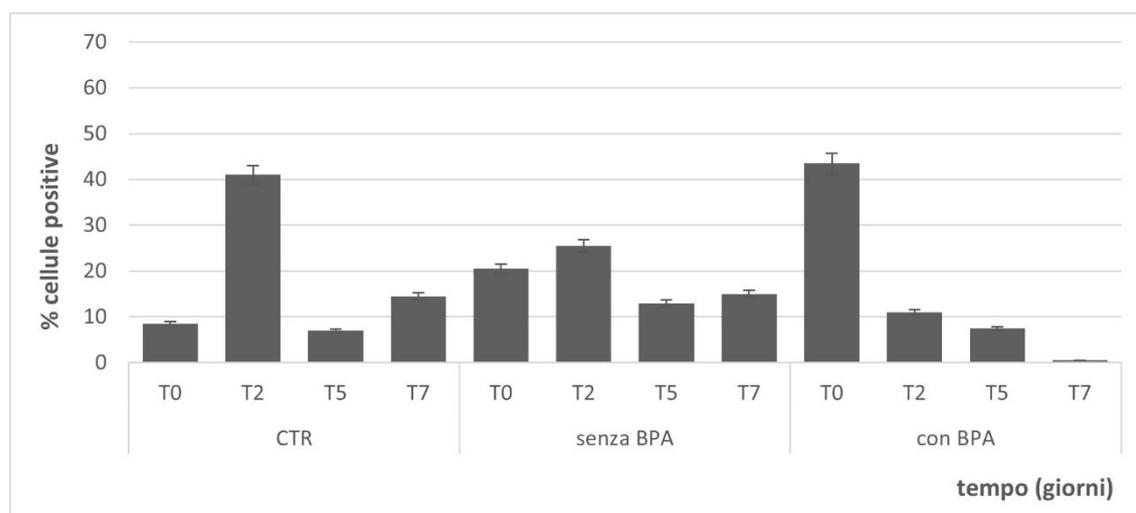
**T0.** A questo tempo di osservazione, il numero di cellule positive alla BrdU nel controllo è meno del 10%. La maggior incorporazione si osserva nel costrutto irraggiato ma privo di BPA, dove il 23,5% delle cellule ha incorporato la BrdU. Il costrutto irraggiato dopo incubazione con BPA ha un livello di positività alla marcatura decisamente basso (2,5%).

**T2.** Rispetto al campione di controllo, in cui le cellule positive sono il 10,5%, nel campione privo di BPA, il valore diminuisce (4%) per poi aumentare fino al 20,5% di cellule positive.

**T5.** Il numero di cellule positive alla marcatura per BrdU aumenta linearmente al quinto giorno: si passa dal 3,5% nel controllo, al 7,5% nel campione senza BPA fino all'11,5% di positività nel campione con BPA.



**Figura 28.** Immunomarcatura anti-BrdU delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di BrdU. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



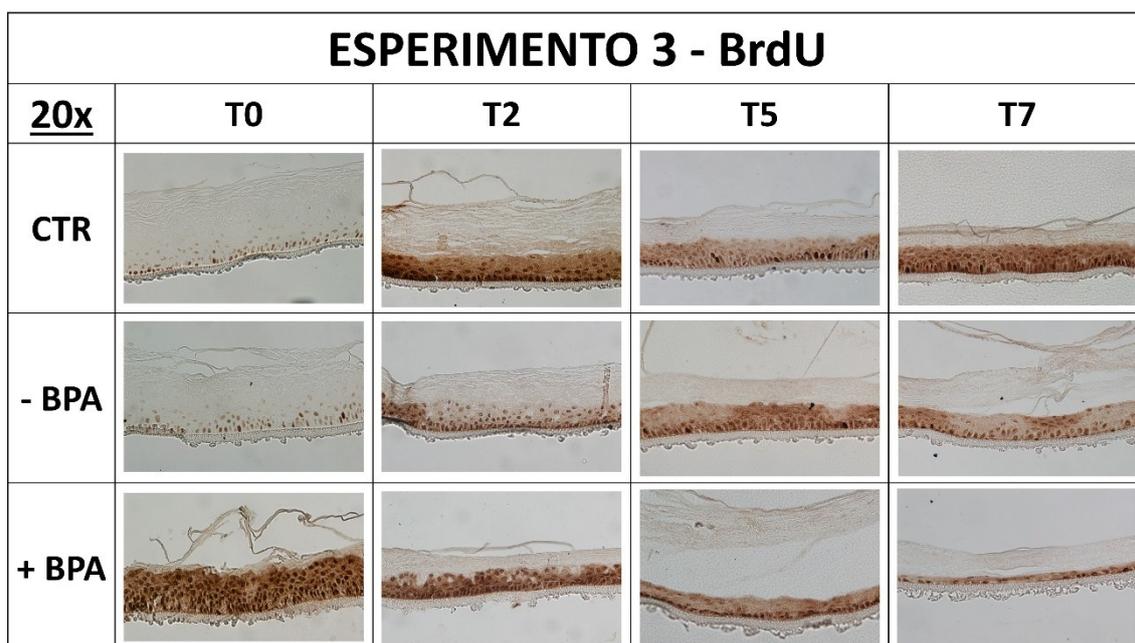
**Figura 29.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 28, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Nel campione CTR, la positività alla marcatura anti-BrdU è dell'8,5%. Valore che aumenta sia nel campione privo di BPA (20,5%) che nel campione con BPA (43,5%).

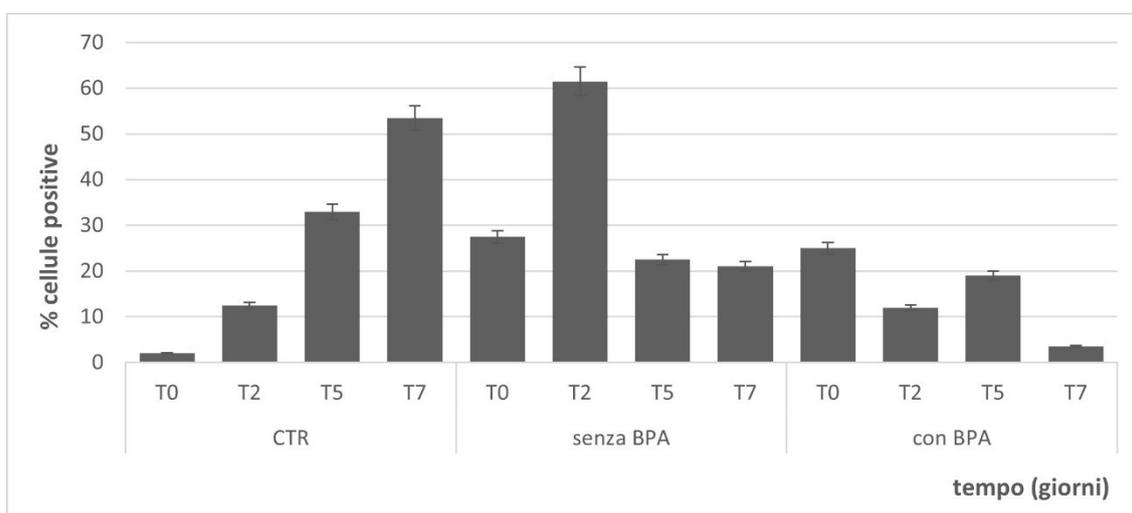
**T2.** Il massimo valore di positività si osserva nel campione di controllo (41%). La percentuale di cellule positive diminuisce nel campione privo di BPA (25,5%) e anche in quello che ha incorporato la BPA (11%).

**T5.** Il 7% delle cellule della sezione di controllo è positivo alla marcatura. Il valore ha un andamento altalenante, con una percentuale di positività che aumenta nel campione privo di BPA (13%) e diminuisce nel campione con BPA, riportandosi ad un valore analogo al CTR (7,5%).

**T7.** Al settimo giorno, le cellule che nel campione di controllo dimostrano positività alla marcatura sono il 14,5%, valore che rimane pressoché stabile nel campione privo di BPA (15%) e che diminuisce fin quasi ad azzerarsi nel campione con BPA (0,5%).



**Figura 30.** Immunomarcatura anti-BrdU delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di BrdU. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 31.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 30, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Nel campione di controllo, la positività alla marcatura è molto bassa, 2%. Nel campione privo di BPA e in quello con BPA, la positività aumenta ed è simile, rispettivamente del 27,5% e del 25%.

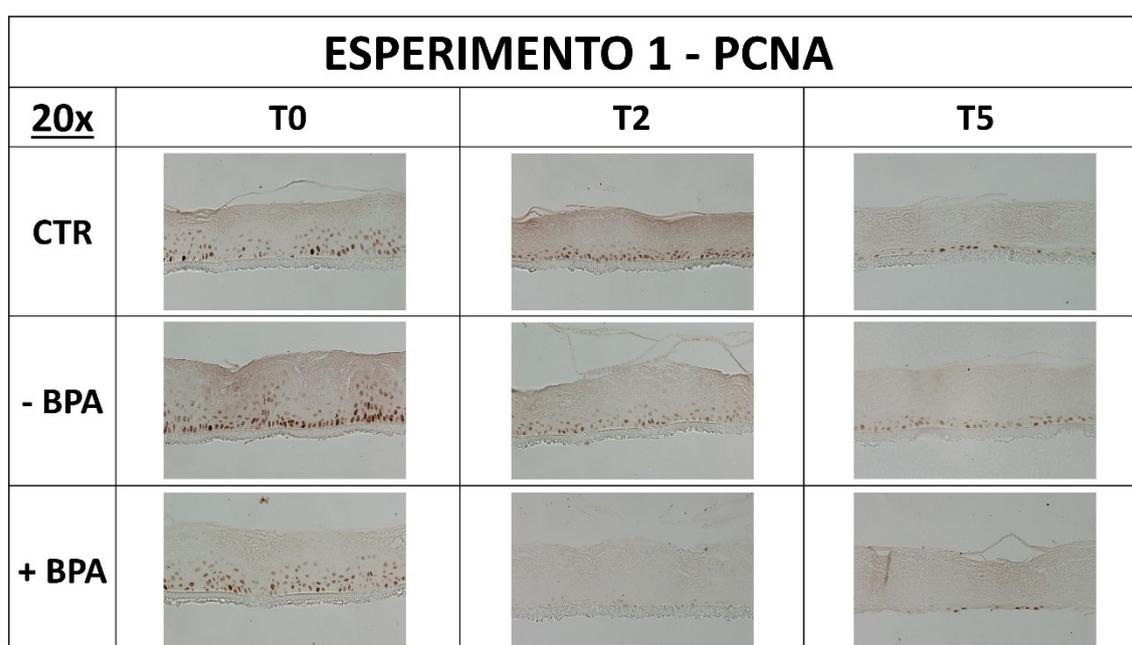
**T2.** A questo tempo di osservazione, la positività delle cellule alla BrdU ha un andamento altalenante: 12% nel campione di controllo, picco nel campione senza BPA (61,5%), diminuzione nel campione con BPA (12%).

**T5.** La positività alla marcatura anti-BrdU è elevata nel campione di controllo (33%); valore che diminuisce nel campione privo di BPA (22,5%) e si mantiene simile nel campione con BPA (19%).

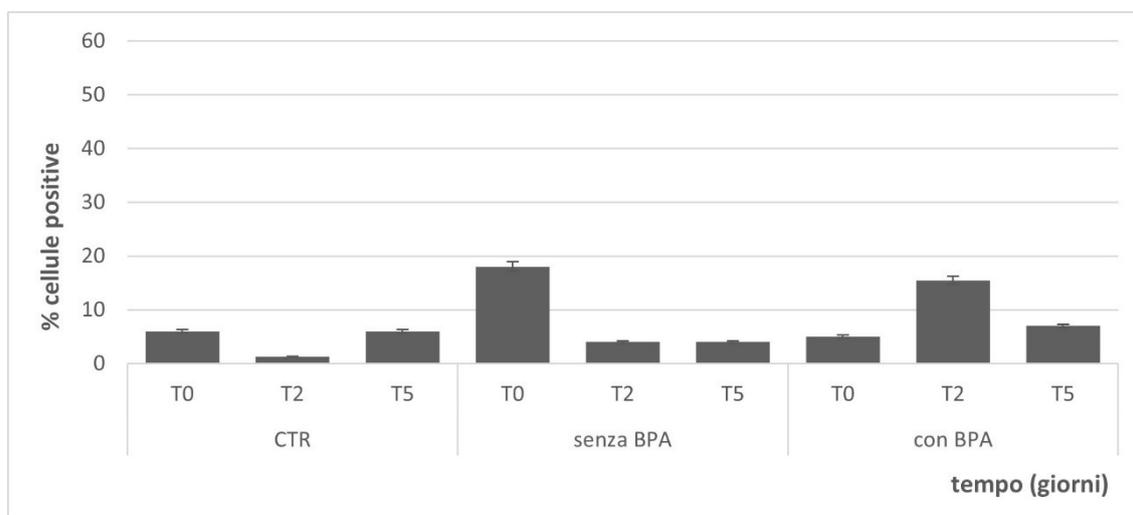
**T7.** L'andamento del valore di positività al settimo giorno diminuisce linearmente: da una positività del 53% nel controllo, si passa al 51% di cellule positive nel campione privo di BPA e al 3,5% di cellule positive nel campione con BPA.

### ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA DELL'ESPRESSIONE DI PCNA

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni dei costrutti immunomarcanti con anticorpo anti-PCNA, alle diverse condizioni. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano l'andamento della positività delle cellule delle sezioni analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. da 32 a 37)



**Figura 32.** Immunomarcatura anti-PCNA delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2 e T5. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di PCNA. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.

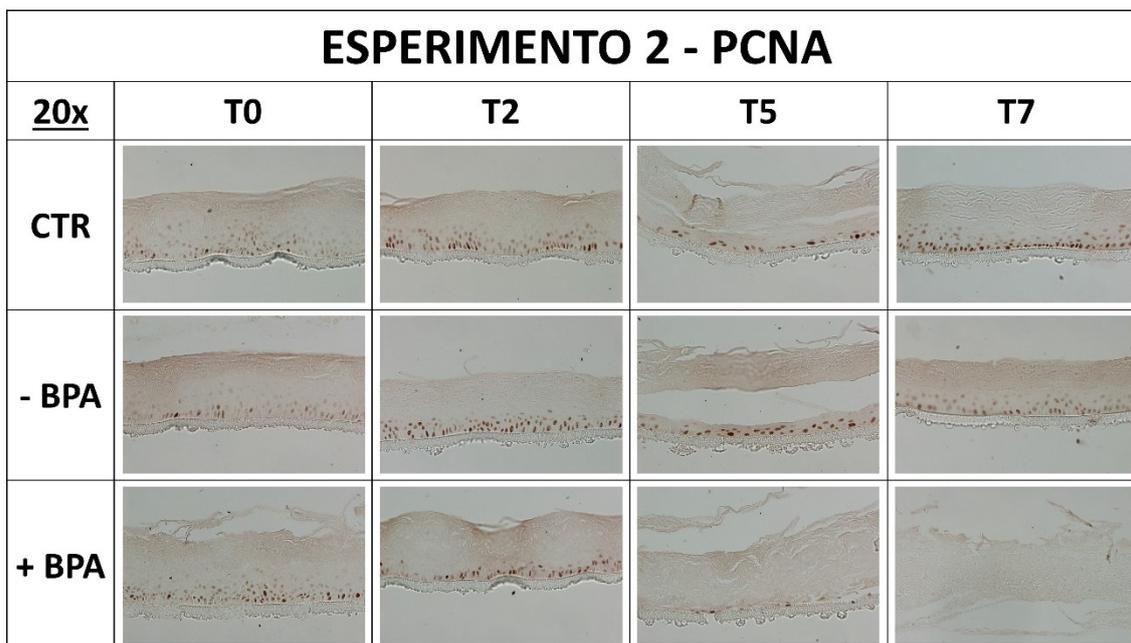


**Figura 33.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 32, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2 e T5).

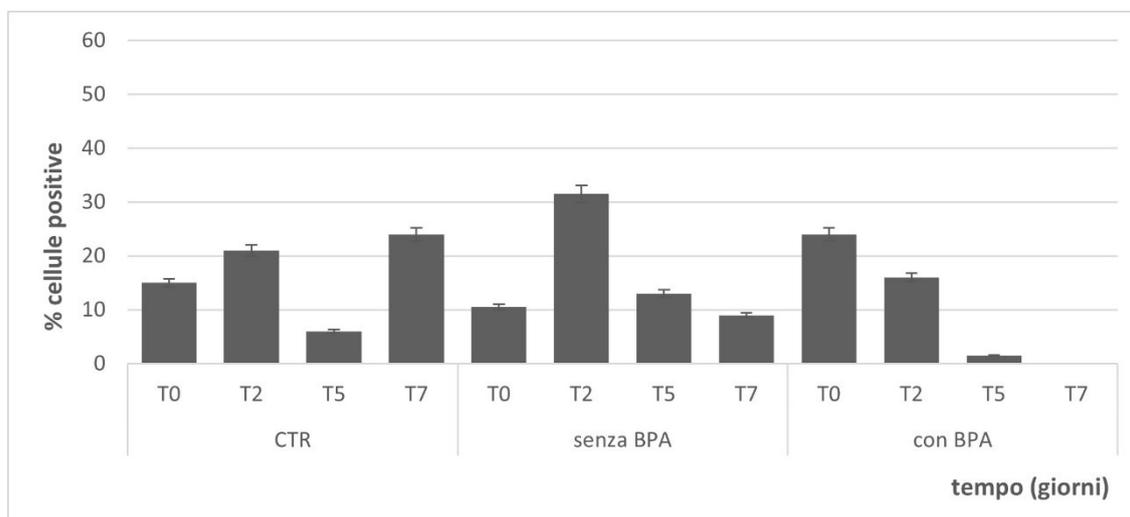
**T0.** Le percentuali di cellule positive alla marcatura con PCNA nei campioni di controllo e incubati con BPA sono analoghe, rispettivamente il 6% e il 5%. Nel campione privo di BPA, la positività è tripla rispetto al campione di controllo (18%).

**T2.** La positività all'immunomarcatura è crescente: nel campione di controllo è bassa (1,5%), aumenta nel campione privo di BPA (4%) e si raggiunge un picco nel campione con BPA (15,5%).

**T5.** Al quinto giorno, i campioni mostrano un'analogia positività alla marcatura, con variazioni minime. Il controllo mostra il 6% di cellule positive, il campione privo di BPA il 4% e il campione con BPA il 7%.



**Figura 34.** Immunomarcatura anti-PCNA delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di PCNA. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 35.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 32, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

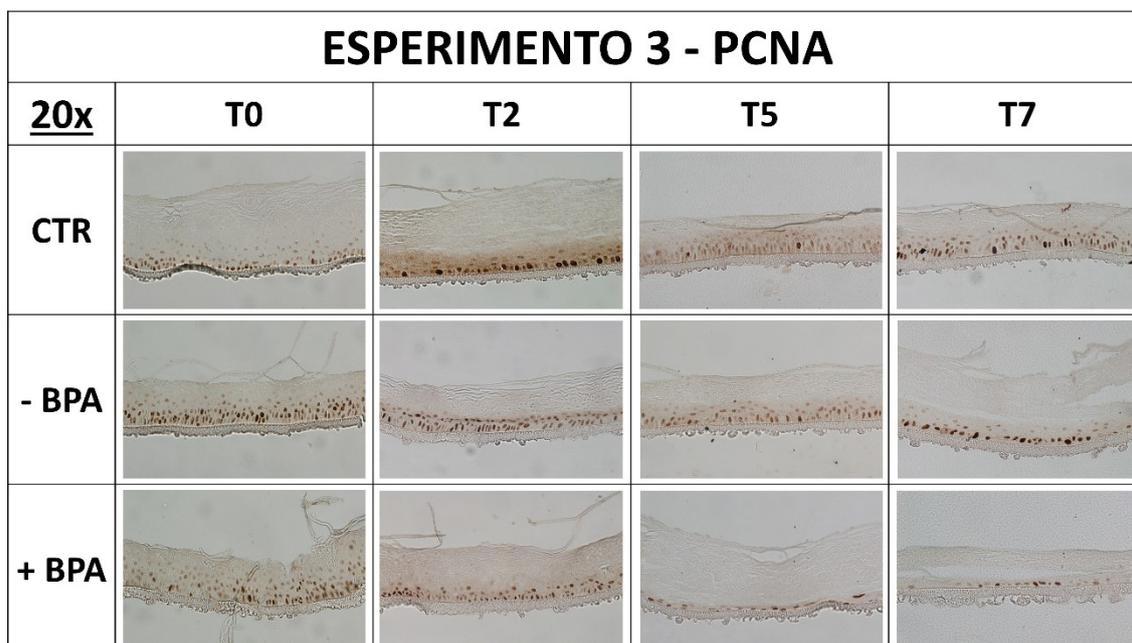
**T0.** Il campione di controllo mostra una positività alla marcatura del 15%; un valore significativamente inferiore è osservabile nel campione privo di BPA (10,5%).

Diversamente, nel campione con BPA la positività è aumentata al 24%.

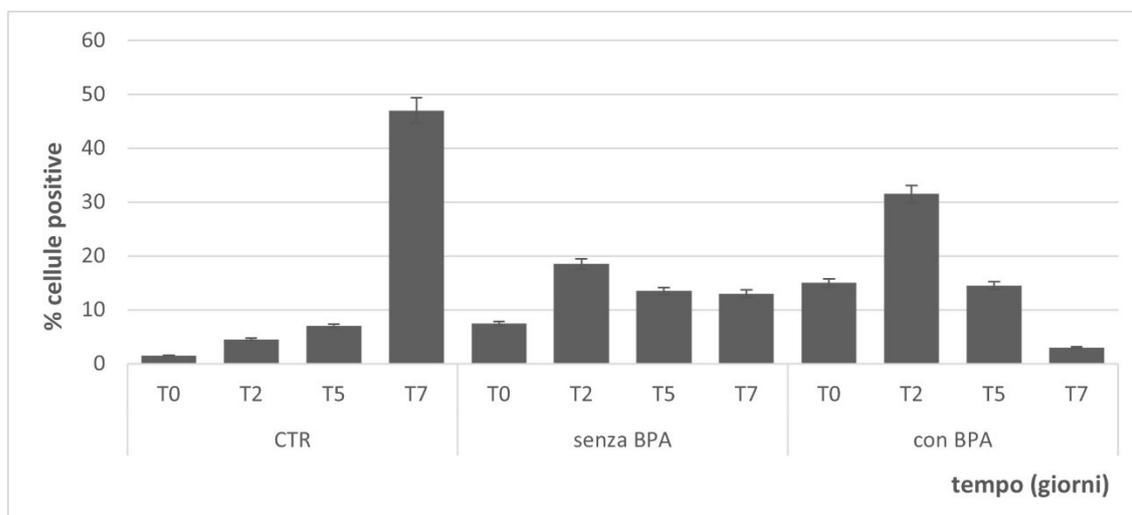
**T2.** La positività al secondo giorno ha un andamento altalenante nei campioni alle 3 condizioni: nel campione di controllo le cellule positive sono il 21%, c'è un picco di positività nel campione senza BPA (31,5%) e il valore è inferiore nella sezione con BPA (16%).

**T5.** L'andamento è simile a quello osservato al T2, con valori di positività differenti: nel campione di controllo, il valore (6%) è inferiore rispetto a quello osservato nel campione privo di BPA (13%), e la positività è quasi nulla nel campione con BPA.

**T7.** Al settimo giorno, la positività decresce linearmente, fino ad azzerarsi. Nel controllo, la percentuale di cellule positive è del 24%; nel campione senza BPA la positività è del 9%; nel campione con BPA non ci sono cellule positive.



**Figura 34.** Immunomarcatura anti-PCNA delle sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di PCNA. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 35.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 32, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

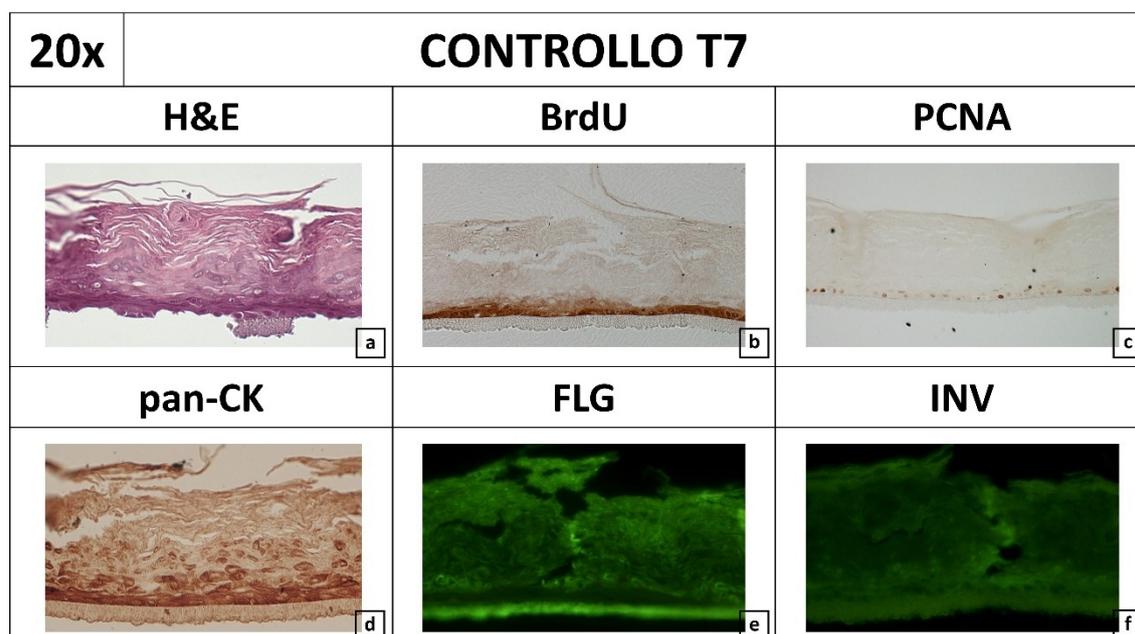
**T0.** A questo giorno di osservazione, la positività alla marcatura aumenta gradualmente, passando dall'1,5% nel campione di controllo, al 7,5% nel campione privo di BPA e al 15% nella sezione di campione con BPA.

**T2.** Si osserva un aumento graduale anche al secondo giorno. Nel controllo, la positività è del 4,5%, aumenta al 18,5% nel campione privo di BPA e raggiunge un picco al 37% nel campione con BPA.

**T5.** La positività alla marcatura aumenta anche tra controllo (7%) e campione senza BPA (13,5%); il valore è pressoché stabile nel campione incubato con BPA (14,5%).

**T7.** Il campione di controllo del settimo giorno mostra un elevatissimo valore di positività alla marcatura per PCNA (47%); il valore è ridotto nel campione privo di BPA (13%) e decresce ulteriormente nel campione con BPA.

## CONFRONTO TRA TUTTE LE ANALISI AL TEMPO T7



**Figura 36.** Confronto tra campioni di controllo al tempo T7. Sono presenti tutte le analisi eseguite sui costrutti *SkinEthic<sup>TM</sup>*: colorazione con Ematossilina ed Eosina (a); marcatura anti-BrdU (b); marcatura anti-PCNA (c); espressione delle pan citocheratine (d); marcatura in fluorescenza per filaggrina (e) ed involucrina (f). Immagini scattate con ingrandimento 20x.

Nella Fig. 36 sono riportate le immagini relative ai campioni di controllo dell'esperimento 1, osservati al tempo T7. Le immagini a, b e c fanno parte di questa tesi; le immagini d, e ed f fanno parte della tesi di laurea del mio collega Francesco Iacullo, che si è occupato della valutazione delle alterazioni morfologiche osservabili nei campioni di costrutto *SkinEthic<sup>TM</sup>* sottoposto a radiazione BNCT e irraggiamento con fotoni.

Da questo confronto, è possibile osservare l'effetto del solo fattore tempo su tutti i campioni.

Nell'immagine a, la colorazione con H&E evidenzia come gli strati cellulari non siano più riconoscibili; le poche cellule presenti hanno una morfologia difficilmente riconducibile

a quella dei cheratinociti presenti in un campione di controllo al tempo T0. Sono poche le cellule vitali e la maggior parte hanno nuclei ormai picnotici. Lo strato corneo è molto presente e il supporto in policarbonato è assente.

Nell'immagine b si osserva una positività alla marcatura anti BrdU molto ridotta, limitata a 2 o 3 cellule.

Le cellule positive alla marcatura anti PCNA (immagine c) sono molto ridotte: è possibile riconoscere 4 nuclei marcati.

La marcatura per le pan citocheratine, proteine dei filamenti intermedi che si aggregano in fibrille e interagiscono con i desmosomi (immagine d), è abbondantemente presente: i livelli di espressione di queste proteine restano costanti nel tempo.

Infine, la marcatura in immunofluorescenza per filaggrina (immagine e) ed involucrina (immagine f), proteine coinvolte nel mantenimento dell'integrità dello strato corneo, non evidenzia alcuna positività cellulare.

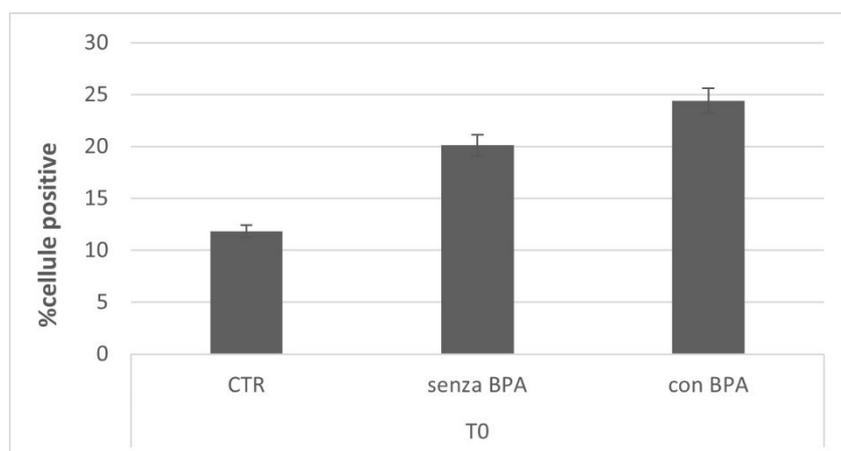
**ESPRESSIONE Ki-67**

L'analisi immunohistochimica per valutare l'espressione di Ki-67 è stata ottenuta in soli 3 vetrini dell'Esperimento 1, tempo T0.

Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa. I frammenti sono apparsi molto danneggiati dal punto di vista morfologico. È stato possibile acquisire immagini dei campioni con ingrandimento 20x.(Fig. 37 e 38)

<b>ESPERIMENTO 1 - Ki67</b>	
<b>20x</b>	<b>T0</b>
<b>CTR</b>	
<b>- BPA</b>	
<b>+ BPA</b>	

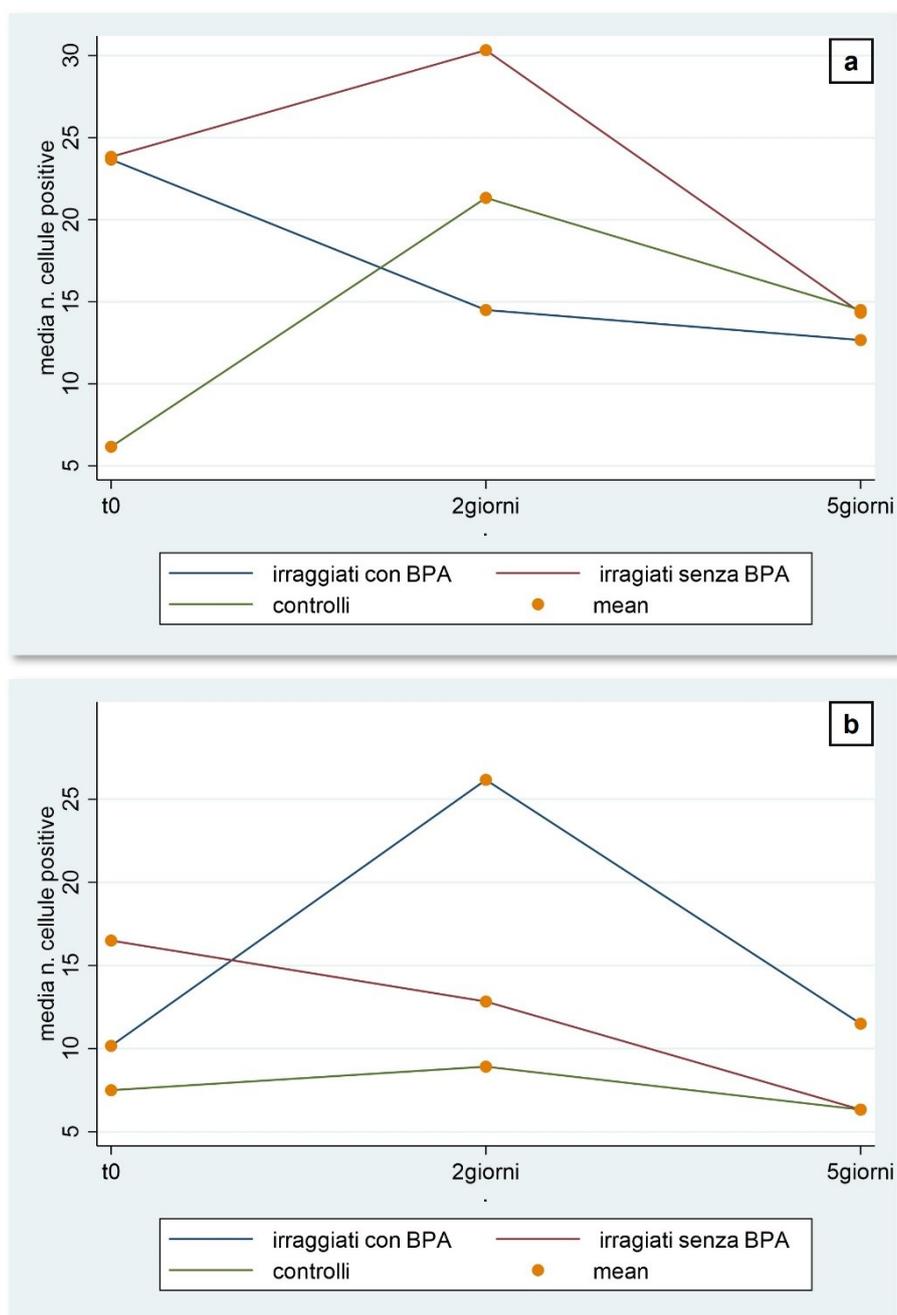
**Figura 37.** Sezioni di campioni controllo (CTR), privi di BPA (-BPA) e con BPA (+BPA) al tempo T0, immunomarcate per Ki-67 e fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 38.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 37, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, -BPA, +BPA), al tempo T0.

L'andamento delle cellule positive all'immunomarcatura per Ki-67 è crescente: la positività nel campione di controllo è all'11%, nel campione privo di BPA corrisponde al 20% e nel campione con BPA sono state osservate il 24% di cellule positive a Ki-67.

## 5.1.3 ANALISI STATISTICA DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA



**Figura 39.** Grafici relativi all'analisi statistica che analizza l'andamento dei valori medi di positività cellulare all'immunomarcatura per BrdU (a) e per PCNA (b) ottenuti con il test Kruskal-Wallis.

**Analisi statistica della positività di immunomarcatura per Bromodesossipurina (BrdU)**

La media del numero di cellule positive dei campioni dei gruppi controllo, irraggiati ma non incubati con BPA e irraggiati e incubati con BPA, osservati ai tempi T0, T2, T5 (e T7) e standardizzato per area, non varia in modo statisticamente significativo ( $p > 0.05$  per T0, T2, T5) a causa del ridotto numero di campioni analizzati e dell'elevata variabilità, dovuta al fatto che, per ogni tempo e condizione, si considerano campioni diversi.

Tuttavia, dall'osservazione dei grafici è possibile concludere che l'andamento della media del numero di cellule proliferanti nei campioni controllo e nei campioni irraggiati ma non incubati con BPA, è analogo seppur con valori diversi: partendo da un basso numero di cellule positive al T0, l'andamento delle curve è altalenante, con una crescita che porta ad un picco al T2, seguita da una fase decrescente al T5.

Nei campioni irraggiati e incubati con BPA si osserva, rispetto ai campioni controllo, una variazione dei valori di positività, con andamento opposto: nei campioni controllo, il picco di cellule positive è al T2, i campioni trattati mostrano una progressiva riduzione del numero medio di cellule proliferanti, con la minor positività al T5.

**Analisi statistica della positività di immunomarcatura per PCNA**

Il valore medio relativo alla positività delle cellule al marcatore PCNA, osservato nei campioni controllo, irraggiati ma privi di BPA e irraggiati e incubati con BPA, ai tempi T0, T2, T5 (e T7) non varia in modo statisticamente significativo ( $p > 0.05$  per T0, T2, T5) a causa del ridotto numero di campioni analizzati e dell'elevata variabilità, dovuta al fatto che, per ogni tempo e condizione, si considerano campioni diversi.

È stata comunque studiata la variazione del valor medio di positività delle cellule al marcatore, confrontando la percentuale di cellule positive nei campioni privi di BPA e con BPA rispetto ai campioni di controllo osservati ai tempi T0, T2, T5 (e T7). Il numero

di cellule positive è stato standardizzato per uno stesso valore di area arbitrario, e non varia in modo statisticamente significativo ( $p > 0.05$  per T0 vs T2, T2 vs T5 e T0 vs T5), a causa del ridotto numero di casi analizzati e all'elevata variabilità dovuta al fatto che, per ogni tempo e condizione, si considerano campioni diversi.

Tuttavia, confrontando i diversi casi si può vedere un andamento analogo tra campioni controllo e campioni irraggiati e con BPA, nonostante i valori medi siano superiori nei campioni irraggiati.

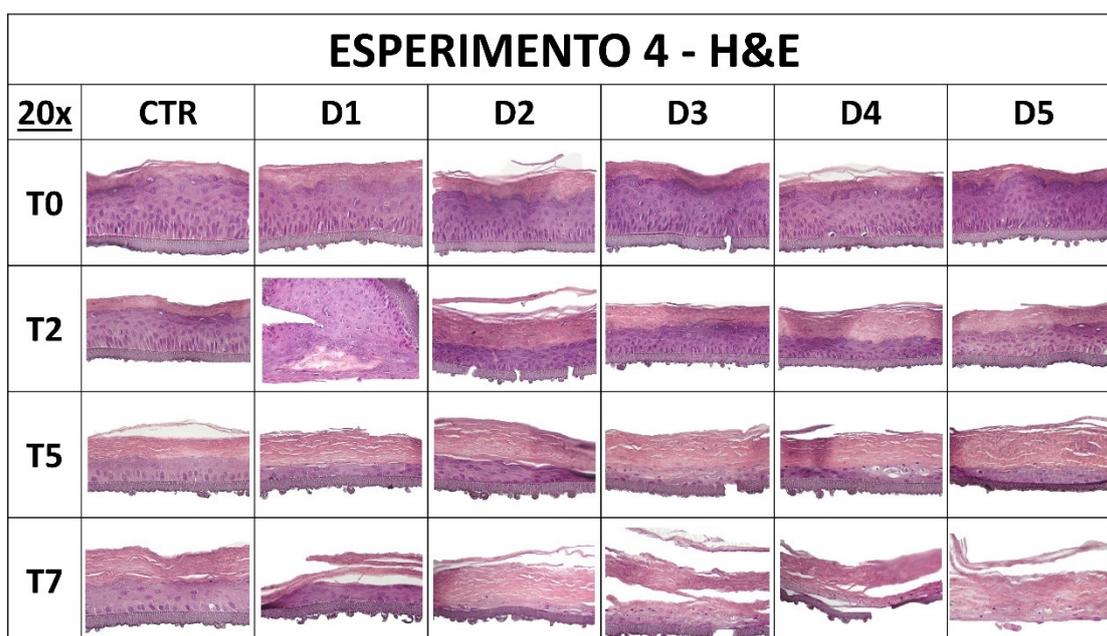
Dal confronto tra campioni controllo e campioni irraggiati ma privi di BPA si osservano due *trend* diversi: altalenante nei campioni controllo e discendente nei campioni irraggiati.

Dal confronto dei dati relativi all'espressione dei due marcatori nei campioni controllo, possiamo osservare che ad un andamento altalenante dell'espressione di BrdU, con picco in T2, si associa un andamento decrescente dell'espressione di PCNA, probabilmente ad indicare che il costrutto ha il suo picco di tasso di proliferazione in T2 che poi va a diminuire, a cui si associa un andamento decrescente del valore di PCNA, per cui i meccanismi di riparazione sono attivi ma diminuiscono. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la validità del costrutto è garantita per 7 giorni, durante i quali le cellule vanno progressivamente incontro ad apoptosi e a inattivazione dei meccanismi di riparazione.

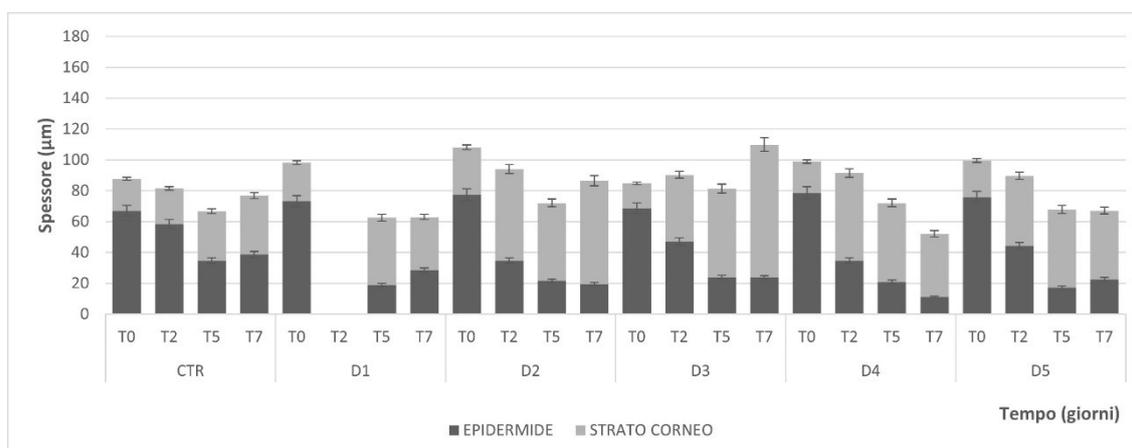
## 5.2 CAMPIONI IRRAGGIATI CON RAGGI X

### 5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni colorate con H&E dei costrutti irraggiati con raggi X alle diverse condizioni temporali. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano gli spessori delle sezioni analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. 40 e 41)



**Figura 40.** Colorazione con Ematossilina (blu, viola) ed Eosina (rosa) di campioni controllo (CTR), e sottoposti a 5 dosi di radiazione crescenti (D1, D2, D3, D4, D5), ai tempi T0, T2, T5 e T7. Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 41.** Grafico corrispondente alla misura (in  $\mu\text{m}$ ) dello spessore (strato corneo e strato cellulare) dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 40, sottoposti a 5 dosi di radiazione crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Tutti i campioni osservati subito dopo l'esposizione alla radiazione presentano un'architettura tissutale ben conservata; sono ben distinguibili tutti gli strati cellulari e la componente vitale è più abbondante rispetto allo strato corneo. La sezione con lo spessore maggiore si osserva nel campione D2 (108,26  $\mu\text{m}$ ).

**T2.** Nel campione di controllo, la sezione ha uno spessore ridotto rispetto al T0 CTR, ma tutte le sezioni osservate a questa tempistica, hanno dimensioni simili. L'architettura del tessuto è mantenuta e si riconoscono chiaramente tutti gli strati epidermici. Lo strato corneo è sottile e non si osserva desquamazione.

All'aumentare della dose di radiazione, nei campioni dal D2 al D5, architettura e morfologia del tessuto sono mantenute; variano gli spessori: è visibile un assottigliamento dello strato epidermico vitale, nello strato spinoso e granuloso, che si associa ad un'aumentata presenza dello strato corneo, a livello del quale si osserva un inizio di desquamazione (D2 e D4).

Fa eccezione il campione D2. Il costrutto risulta estremamente danneggiato e, al momento del taglio, è stato possibile isolare una sezione con una geometria anomala rispetto agli altri campioni. Infatti, non è stato possibile calcolarne i relativi spessori.

**T5.** Il campione di controllo è più sottile rispetto a quelli precedentemente osservati ed è possibile notare l'assenza dello strato granuloso. La morfologia della sezione è simile all'epidermide naturale ma non più perfettamente corrispondente, come nei campioni CTR T0 e CTR T2.

La desquamazione cornea è più maggiormente evidente rispetto alle sezioni fin qui osservate e interessa tutto lo strato corneo.

All'aumentare della dose di radiazione, i costrutti mantengono la loro architettura stratificata ma si perde la morfologia cellulare e non è più possibile distinguere gli strati cellulari. Nei campioni D3 e D4 si osservano alcuni nuclei picnotici, di piccole dimensioni e altamente basofili, ad indicare cellule dall'aspetto apoptotico. Lo strato corneo di tutti i campioni presenta spazi otticamente vuoti, indice di desquamazione che, come nel CTR, interessa tutta la regione cheratinizzata.

Lo spessore delle sezioni è variabile.

**T7.** La sezione relativa al campione di controllo mostra un'architettura simile a quella epidermica ma non più riconoscibile come tale: nello strato basale le cellule non sono cilindriche e strettamente accostate, le cellule dello strato spinoso non hanno più il loro aspetto caratteristico ed è presente qualche cellula con granuli citoplasmatici.

Gli spazi otticamente vuoti nello strato corneo indicano un inizio di desquamazione.

Nei campioni irraggiati, già alla dose di radiazione minore, 6 Gy, è osservabile una buona degradazione del costrutto, con ampi spazi otticamente vuoti presenti nello strato corneo, che diventano sempre più ampi all'aumentare della dose di radiazione. Alla massima dose di radiazione, 108 Gy, è possibile notare la perdita dello strato di supporto in policarbonato.

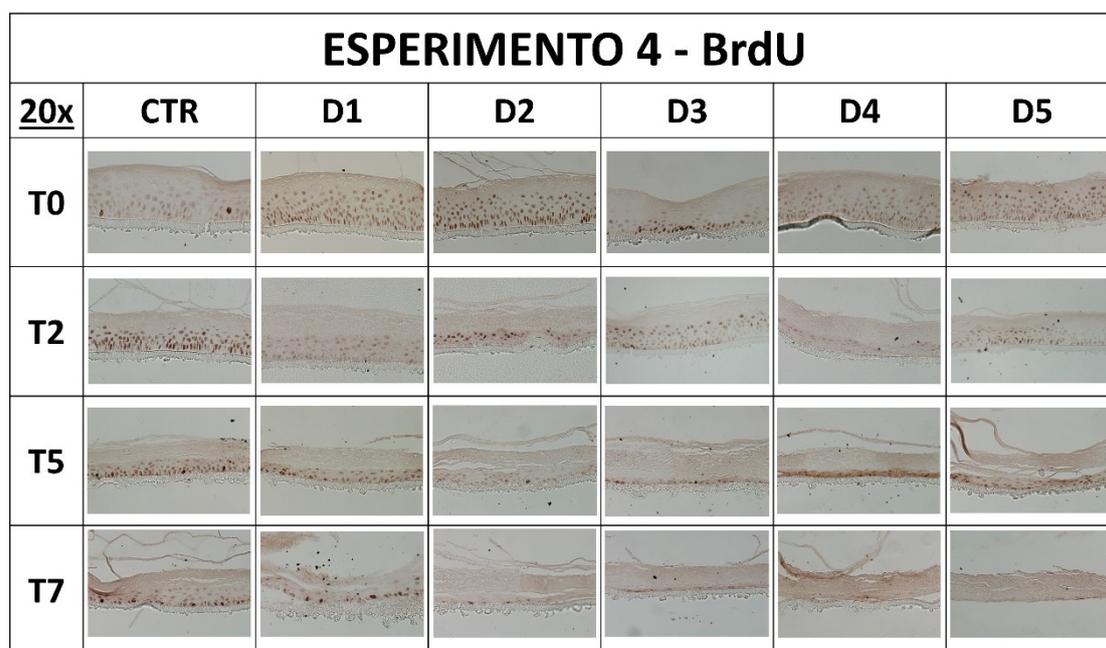
Morfologia e istoarchitettura sono completamente alterate rispetto al costrutto di controllo al tempo T0; sono abbondantemente presenti nuclei picnotici ad indicare che le cellule presenti hanno iniziato il processo di degenerazione.

Lo spessore delle sezioni è variabile. Infatti, il costrutto D3 ha una dimensione analoga a quella del campione T0 D2.

## 5.2.2 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICHE DELL'ATTIVITÀ PROLIFERATIVA

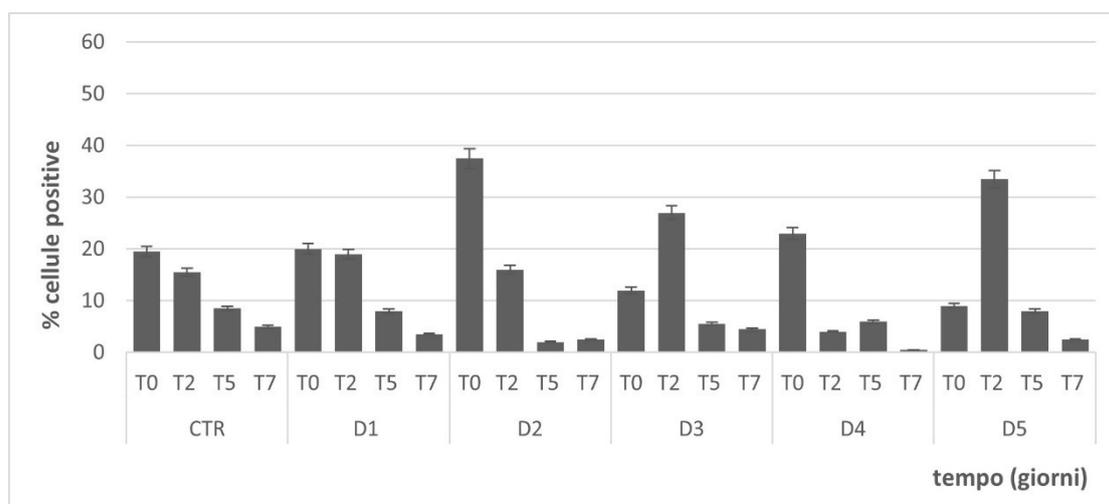
### INCORPORAZIONE BrdU

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni dei costrutti immunomarcanti con anticorpo anti BrdU, alle diverse condizioni precedentemente spiegate. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano l'andamento della positività delle cellule delle sezioni analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. 42 e 43).



**Figura 42.** Immunomarcatura anti BrdU delle sezioni di campioni controllo (CTR), e sottoposti a dosi di radiazione crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di BrdU.

*Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.*



**Figura 43.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 42, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, D1, D2, D3, D4, D5), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** Osservando le sezioni relative ai campioni appena irraggiati, è possibile notare come l'andamento della positività alla marcatura sia altalenante: il picco di positività (37,5%) è al campione D2, con una dose di radiazione di 12 Gy. La minor percentuale di cellule positive alla marcatura per BrdU si osserva nel campione D5 che ha ricevuto la radiazione massima.

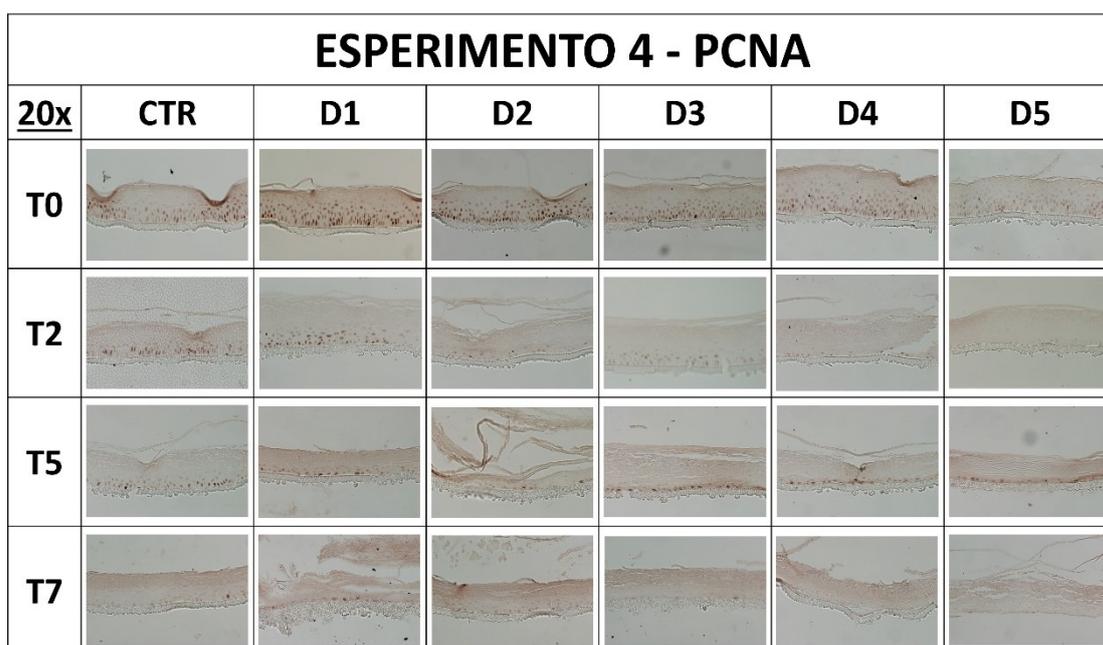
**T2.** Al secondo giorno, il campione di controllo ha una positività alla marcatura minore rispetto al tempo T0. Anche in questa serie di campioni osservati, la positività non segue un andamento lineare: il valore di positività massimo (33,5%) è rilevato con la massima dose di radiazione somministrata, 108 Gy; alla dose D4 solo il 4% di cellule risulta proliferante.

**T5.** Le sezioni osservate a questa tempistica, mostrano una costante e ridotta positività alla marcatura, intorno al 6-8%, e la minor presenza di cellule proliferanti si osserva con la dose di radiazione D2, 12 Gy.

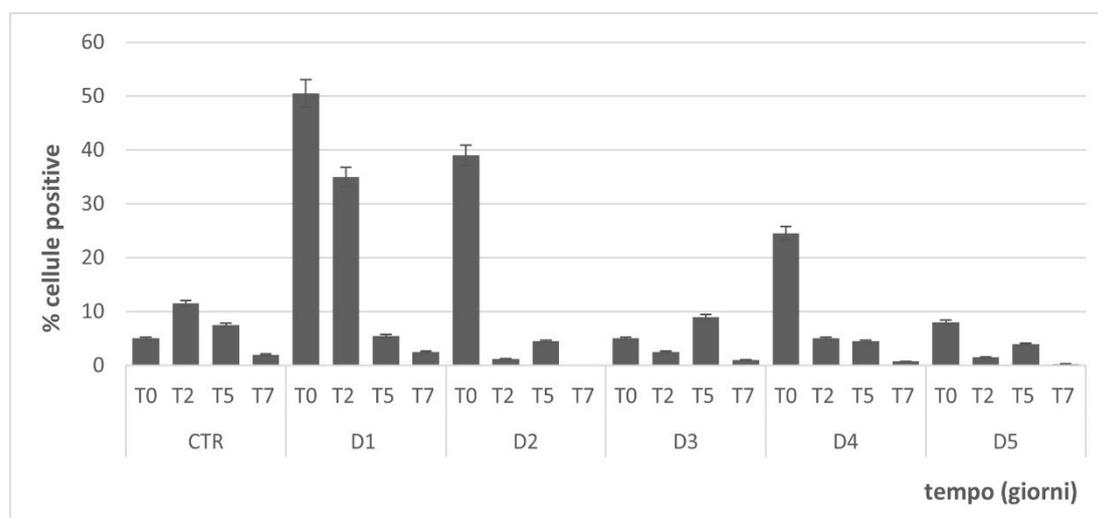
**T7.** Nelle sezioni osservate al giorno 7, le cellule proliferanti sono poco presenti: tutti i valori sono al di sotto del 5%, massima positività registrata nel campione di controllo; la minima percentuale di cellule proliferanti è dello 0,5%, nel campione D4.

## PCNA

Di seguito sono riportate tutte le immagini delle sezioni dei costrutti immunomarcanti con anticorpo anti PCNA, alle diverse condizioni precedentemente spiegate. Le sezioni sono state osservate al microscopio in luce trasmessa e fotografate ad ingrandimento 20x. I grafici mostrano l'andamento della positività delle cellule delle sezioni analizzate nei diversi esperimenti. (Fig. 44 e 45).



**Figura 44.** Immunomarcatura anti PCNA delle sezioni di campioni controllo (CTR), e sottoposti a dosi di radiazione crescenti (D1, D2, D3, D4, D5) ai tempi T0, T2, T5 e T7. I nuclei marcati e colorati di marrone sono positivi alla presenza di PCNA.  
Sezioni fotografate ad ingrandimento 20x.



**Figura 45.** Grafico corrispondente alla positività cellulare dei campioni di SkinEthic™ di Fig. 44, nelle diverse condizioni di irraggiamento (CTR, D1, D2, D3, D4, D5), ai diversi tempi (T0, T2, T5 e T7).

**T0.** I valori di positività alla marcatura anti-PCNA mostrano un andamento altalenante: la massima espressione di PCNA è nel campione D1, che ha ricevuto la più bassa dose di radiazione, 6 Gy, e che ha una percentuale di cellule positive a PCNA del 50,5%. Anche nei campioni D2 e D4 sono molto presenti le cellule positive, rispettivamente il 39% e il 24,5%.

**T2.** Al secondo giorno di osservazione, la positività alla marcatura non ha un andamento lineare e il picco di positività (35%) è nel campione D1, che ha ricevuto la minor dose di radiazione, 6 Gy. A dosi di radiazione crescenti, la positività per PCNA è ridotta, con valori inferiori al 5%.

**T5.** Nelle sezioni osservate al giorno 5, i valori di positività alla marcatura sono abbastanza omogenei e tutti inferiori al 10%. Il valore maggiore è rilevato nel campione D3 che ha ricevuto una dose di radiazione di 24 Gy.

**T7.** Le sezioni osservate a questa tempistica mostrano un andamento del valore di positività alla marcatura che si mantiene a valori molto bassi: la percentuale maggiore

di cellule positive a PCNA si osserva nel campione D1 e nel campione D2, irraggiato con una radiazione di 12 Gy, in cui non sono presenti cellule positive alla marcatura.

## **CAPITOLO 6: DISCUSSIONE**

Dall'analisi morfologica dei costrutti irraggiati, è emerso chiaramente come il tempo di attesa dopo l'irraggiamento e la dose di radiazione assorbita influiscano sull'integrità del modello.

Dalle immagini descritte nel paragrafo 5.1.1 relative alla radiazione con neutroni, nei campioni di controllo, su cui interviene il solo fattore tempo, è possibile osservare come questo influisca sull'integrità del costrutto. È visibile una progressiva desquamazione di tutte le sezioni a livello dello strato corneo, ma non vi sono apprezzabili alterazioni morfologiche nello strato cellulare del modello epidermico. Lo spessore di tutte le sezioni subisce una generale diminuzione, ma non è possibile fare una considerazione statisticamente significativa a causa dell'elevata variabilità che caratterizza il modello scelto per le analisi.

Nei campioni irraggiati con la sola radiazione neutronica, la desquamazione interessa il costrutto fin dalla prima osservazione, subito dopo l'irraggiamento: negli esperimenti 1 e 3, lo strato corneo ha lo stesso aspetto che si osserva nel campione CTR al quinto e al settimo giorno in coltura. I costrutti non subiscono degradazione proporzionalmente alla dose: infatti, ci si aspetterebbe una desquamazione maggiore nel costrutto che è stato sottoposto alla dose di radiazione maggiore (esperimento 2: 11,4 Gy), ma non si apprezzano differenze statisticamente significative tra i tre esperimenti. La regione cellulare del modello non mostra particolari alterazioni morfo-architettoniche, ad eccezione dei campioni T5 degli esperimenti 1 e 2, e del campione T7 dell'esperimento 3, a livello dei quali si riconosce una evidente riduzione della regione cellulare del costrutto; pertanto, non è più possibile riconoscere i caratteristici strati epidermici. Questi valori di dose assorbita, dovuta solo alla componente neutronica (che è determinata principalmente da protoni che provengono dalla cattura neutronica nell'azoto, a LET intermedio), non generano danni apprezzabili alla cute.

La radiazione neutronica associata a incorporazione di agente veicolante (BPA) ha un effetto degradativo più importante rispetto alle condizioni precedentemente analizzate, specialmente nelle sezioni dei costrutti mantenuti in coltura fino al quinto o al settimo giorno: lo strato cellulare è quasi assente e le poche cellule presenti hanno nuclei picnotici; talvolta, il supporto in policarbonato è perso e la degradazione maggiore si osserva ai tempi T5 e T7 dell'esperimento 2, i cui campioni hanno ricevuto una dose di radiazione di 32,5 Gy. In questo caso, i risultati ottenuti sono in linea con l'atteso. Infatti, la dose assorbita in seguito all'irraggiamento con neutroni in presenza di boro, è dovuta soprattutto a componenti di alto LET e in grado di causare danni cellulari più gravi a parità di dose. Inoltre, questi campioni hanno ricevuto dosi molto alte, in confronto a quanto avviene nel trattamento clinico. Infatti, i trattamenti clinici limitano la dose assorbita dalla cute sana a 22 Gy-Eq (Menéndez P. R. et al. 2009) che corrisponde a una dose assorbita (in Gy) minore. Tuttavia, questi esperimenti iniziali avevano lo scopo di ottimizzare il protocollo di studio, imparare a usare i costrutti e misurare degli effetti. Per questo si è preferito lavorare a dosi alte. Inoltre, a causa della variabilità biologica, è molto difficile predire la concentrazione di boro assorbita dai campioni in ogni esperimento. Di conseguenza, si fissa la potenza e il tempo, e la dose assorbita viene calcolata a posteriori dopo aver effettuato la misura del boro nei campioni dedicati volta per volta.

Nel paragrafo 5.2.1, è stata analizzata la morfologia dei costrutti sottoposti a radiazione con fotoni.

In questo caso, nei campioni di controllo si osserva una progressiva perdita dell'architettura tissutale e della morfologia cellulare, oltre ad una lieve desquamazione cornea, un risultato atteso in funzione del progressivo trascorrere dei giorni in coltura del costrutto.

È possibile osservare come non ci siano differenze significative tra i campioni osservati ai tempi T0 e T2, anche sottoposti alla dose di radiazione più elevata. Si possono

distinguere differenze a livello di spessori ma, come precedentemente anticipato, può dipendere dall'elevata variabilità riscontrata tra i campioni. L'architettura tissutale è conservata ed è ancora possibile distinguere la morfologia delle cellule tipiche dei differenti strati.

Al quinto giorno di osservazione, si riconosce un inizio di desquamazione in tutti i campioni. Già dal costrutto che ha ricevuto la dose di radiazione più bassa, non è più possibile riconoscere l'architettura tissutale e dal campione D3, iniziano ad essere presenti cellule dal nucleo picnotico.

Nei campioni osservati al settimo giorno, si può apprezzare il maggior effetto degradativo, anche a dosi non elevate. L'effetto combinato di tempo e radiazione altera significativamente il costrutto, le cui cellule sono ormai apoptotiche e lo strato corneo è completamente degradato.

Da queste considerazioni, è possibile affermare che, a differenza degli effetti osservati nei costrutti irraggiati con BNCT, in cui risulta più difficile individuare una certa riproducibilità e standardizzare l'effetto degradativo, nei costrutti sottoposti a radiazione con fotoni è possibile apprezzare una degradazione e un'alterazione dell'istoarchitettura tissutale più lineari nel tempo e proporzionali alla dose di radiazione ricevuta.

È stato quindi valutato l'effetto del tempo e delle radiazioni sulla proliferazione cellulare del modello *SkinEthic<sup>TM</sup>* (paragrafo 5.1.2) confrontando i dati relativi alla proliferazione cellulare, ottenuti con marcatura anti BrdU, con quelli ottenuti con marcatura anti PCNA, antigene espresso nelle cellule proliferanti che hanno attivato meccanismi di riparazione del DNA.

Nei campioni di controllo delle 3 serie di costrutti sottoposti a BNCT, la percentuale delle cellule positive alla marcatura anti-BrdU ha un andamento altalenante: seppur con valori diversi, gli esperimenti 1 e 2 mostrano un picco di positività al tempo T2, non

osservabile nell'esperimento 3, in cui la percentuale di cellule proliferanti è costantemente crescente. I risultati emersi nei primi 2 esperimenti sono in linea con l'atteso: è possibile che i cheratinociti del costrutto abbiano il massimo numero di cellule proliferanti al secondo giorno e che gradualmente questo valore si riduca nel tempo. Andamento diverso dall'atteso, in base alle caratteristiche del modello definite dall'azienda produttrice, è quello che si osserva nell'esperimento 3, in cui al settimo giorno, quando la vitalità del costrutto dovrebbe essere a termine, le cellule proliferanti sono superiori al 50% di quelle presenti nella sezione.

Nei campioni irraggiati con radiazione neutronica ma privi di agente veicolante, l'andamento dei valori di positività degli esperimenti 2 e 3, irraggiati rispettivamente con 11,4 e 22,7 Gy, sono sovrapponibili: si ritrova il picco di positività al tempo T2 osservato nei campioni di controllo precedentemente analizzati, quasi ad indicare che la radiazione non influisca sulla proliferazione cellulare. Nell'esperimento 1, irraggiato con una dose inferiore alle precedenti (4,5 Gy) si osserva la situazione opposta: la percentuale di positività al secondo giorno di osservazione è inferiore rispetto a quella osservabile nelle sezioni irraggiate ma senza BPA. Pertanto, è possibile considerare T2 come un tempo critico per i valori di proliferazione cellulare relativi alla marcatura anti BrdU.

Le sezioni relative ai costrutti irraggiati con radiazione neutronica dopo incubazione con agente veicolante mostrano valori altalenanti di cellule proliferanti. Nel primo esperimento, è stato osservato il picco di positività al tempo T2; il valore decresce linearmente nelle sezioni a maggior dose di irraggiamento (esperimento 2) e l'andamento dei valori di positività nell'ultimo esperimento è scostante e non sovrapponibile a nessun caso analizzato.

Non è possibile fare delle considerazioni comuni e sistematiche relativamente ai valori rilevati, non c'è riproducibilità, come confermano le analisi statistiche: la variabilità tra costrutti è elevata e non ci sono differenze statisticamente significative.

Nell'immagine 36, è stato fatto un confronto tra i differenti campioni osservati al tempo T7 analizzati in questa tesi e in quella del mio collega Francesco Iacullo. È possibile osservare come il tempo influisca sia sulla proliferazione che sulla morfologia dei costrutti, in quanto la positività a tutte le marcature è molto ridotta.

Il paragrafo 5.2.2 presenta i dati relativi alla percentuale di cellule proliferanti nei campioni sottoposti a radiazione con fotoni.

In questo caso si osservano andamenti differenti: nei campioni controllo, D1 e D2, che hanno ricevuto rispettivamente una dose di radiazione di 6 Gy e 12 Gy, i valori di positività sono diversi ma l'andamento è comune e progressivamente decrescente. L'andamento è sovrapponibile tra i campioni D3 e D5, irraggiati con una dose di radiazione da 24 Gy e 108 Gy e si osserva il picco di positività al tempo T2 precedentemente osservato nei campioni irraggiati con radiazione neutronica. Il campione D4, irraggiato a 36 Gy, mostra un andamento del valore di positività alla marcatura altalenante e analogo a quello osservato nell'esperimento 3 con BNCT.

È quindi possibile concludere che si osserva una minima riproducibilità nei dati ottenuti ma non sufficiente da poter confermare con certezza quello che è l'effetto della radiazione sulla proliferazione cellulare. Anche in questo caso, non c'è una variabilità statisticamente significativa.

Oltre ai dati sulla proliferazione cellulare analizzati con il saggio di incorporazione della BrdU, è stata valutata l'attivazione dei meccanismi di riparazione cellulare attraverso la quantificazione delle cellule positive all'espressione della proteina PCNA (paragrafo 5.1.2), presente nei nuclei delle cellule che hanno innescato il processo riparativo.

Nel primo esperimento con BNCT, i valori di positività per PCNA nel campione di controllo sono ridotti ( $\leq 6\%$ ) e l'andamento è opposto a quello ottenuto per BrdU. Per questo motivo, si può pensare che in assenza di radiazione, l'aumentare del numero di cellule proliferanti non sia strettamente correlato all'attivazione dei meccanismi di

riparazione cellulare. Tuttavia, negli altri campioni di controllo, non sono stati osservati i medesimi *trend*. Gli andamenti dei valori di positività di BrdU e PCNA sono sovrapponibili tra loro nei singoli esperimenti: nell'esperimento 2, gli andamenti sono altalenanti e c'è corrispondenza nel picco di positività al secondo giorno di osservazione; nell'esperimento 3, la positività è crescente sia per BrdU che per PCNA.

Dal confronto tra i diversi andamenti delle percentuali di cellule positive relativi ai campioni irraggiati con soli neutroni, ci sono corrispondenze con i valori ottenuti negli esperimenti con BrdU. In particolare, nell'esperimento 2 che ha ricevuto una dose di radiazione di 11,4 Gy, l'andamento è analogo fino al quinto giorno: si ritrova un picco di positività al tempo T2 ma al settimo giorno l'espressione di PCNA diminuisce rispetto all'incorporazione della BrdU. Potrebbe significare che la proliferazione cellulare stia aumentando grazie ai meccanismi di riparazione precedentemente attivati.

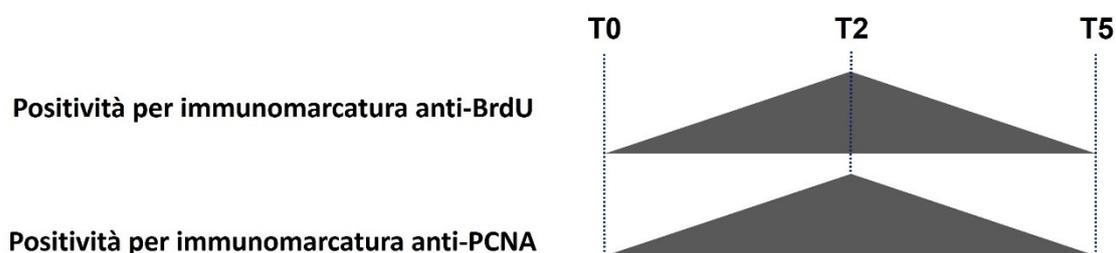
Nel terzo esperimento c'è completa corrispondenza tra i due andamenti di positività: la maggior percentuale di cellule positive è al secondo giorno, come se il danno causato dalla radiazione fosse stato riparato e, pertanto, le cellule sono altamente proliferanti.

Dall'analisi dei valori ottenuti nei campioni irraggiati con BNCT, negli esperimenti 1 e 2, presi singolarmente, c'è sovrapposibilità negli andamenti della positività cellulare ai due marcatori. Nell'esperimento 1, è presente un picco di positività al T2 mentre i valori rilevati negli altri due giorni di osservazione sono minori; nell'esperimento 2, la positività ad entrambi i marcatori decresce nel tempo. Questi campioni sono stati sottoposti a una dose di radiazione rispettivamente di 32,5 Gy e 160 Gy, maggiore rispetto a quella somministrata ai campioni dell'esperimento 1 e questo potrebbe essere significativo ai sensi dell'interpretazione, in quanto una dose di radiazione così elevata potrebbe aver inibito l'attivazione dei meccanismi di riparazione cellulare. Anche la proliferazione ne ha risentito, come dimostra la diminuzione di cellule BrdU positive all'aumentare del tempo.

Nell'esperimento 3, i *trend* dei valori rilevati sono opposti. L'andamento della positività per PCNA è sovrapponibile a quello che è stato osservato nei campioni irraggiati con sola radiazione neutronica, degli esperimenti 2 e 3 ed è possibile osservare il picco di positività al tempo T2.

Nel campione di controllo dei costrutti irraggiati con radiazione con fotoni (paragrafo 5.2.2), ricorre il picco di positività in T2, caratteristica comune a numerosi casi precedentemente discussi.

Nonostante non ci sia un unico andamento lineare relativo ai valori di positività cellulare alle immunomarcature che sono state studiate in questa tesi, quello che è stato più frequentemente riscontrato è un aumento di positività al tempo T2, sia per l'attività di sintesi del DNA (BrdU) sia per l'attività di proliferazione, espressa dall'aumento di espressione dell'antigene di proliferazione cellulare PCNA, associato anche ai meccanismi di riparazione del DNA. (Fig. 46).



**Figura 46.** Trend di positività cellulare ai marcatori BrdU e PCNA più frequentemente osservati.

Tuttavia, questo andamento non ricorre nei dati relativi alle diverse sezioni di campioni irraggiati che sono stati analizzati: nei campioni D1 e D4, rispettivamente irraggiati con una radiazione da 6 Gy e 36 Gy, la positività a PCNA decresce nel tempo; nei campioni D2, D3 e D5, la cui radiazione ricevuta è rispettivamente di 12 Gy, 24 Gy e 36 Gy, il valore percentuale di cellule positive è altalenante nel tempo.

Infine, la positività alla marcatura per Ki-67 (paragrafo 5.1.2) subito dopo il trattamento con BNCT mostra come ci sia una maggior percentuale di cellule proliferanti nel campione irraggiato e incubato con BPA rispetto al controllo, dovuto probabilmente alla variabilità tra costrutti.

## CAPITOLO 7: CONCLUSIONI

Questo lavoro di ricerca ha l'obiettivo di studiare gli effetti della radiazione neutronica utilizzata in BNCT sul tessuto epidermico, in funzione della dose. Per questo scopo, è stato scelto di sottoporre a radiazioni con neutroni, a diverse dosi, il modello di epidermide umana ricostruita *SkinEthic™*, costruito epidermico coltivato *in vitro* costituito da cheratinociti umani ottenuti da donatori diversi e posti in coltura su un filtro inerte in policarbonato.

L'obiettivo finale del più ampio progetto di studio su BNCT di cui fa parte questa tesi è ottenere un elevato numero di dati biologici per riuscire a sviluppare un modello dosimetrico da utilizzare per esprimere la dose da BNCT in unità fotone-equivalente. A questo scopo, è auspicabile riuscire a costruire una curva di probabilità di complicazioni su tessuti normali, *Normal Tissue Complication Probability* (NTCP) utilizzando BNCT e fotoni. La dose isoeffettiva a fotoni è la dose data dalla BNCT che determina la stessa NTCP che causa l'irraggiamento con fotoni. Questa equivalenza permette di prescrivere la dose di radiazione da BNCT con la sicurezza che i danni al tessuto sano siano sotto la soglia di tollerabilità, sfruttando appieno il vantaggio terapeutico nel tumore dato dalla maggiore concentrazione del boro. L'intento ultimo è identificare la dose di radiazione che causa il minimo danno cutaneo accettabile, a fronte di un effetto terapeutico antitumorale superiore.

La BNCT è la terapia antitumorale che si basa sulla cattura neutronica nel boro che, da letteratura, dimostra una selettiva ed elevata efficienza nella distruzione delle cellule tumorali: la somministrazione di un composto borato come la BPA, internalizzato dalle cellule iper esponenti la proteina di membrana LAT1, tipicamente cancerose, garantisce la selettività della terapia, prevenendo la distruzione delle cellule sane circostanti.

Numerosi studi dimostrano una superiore efficienza terapeutica della BNCT rispetto alla radioterapia convenzionale, basata sulla radiazione con fotoni (radiazione di riferimento), ad una minor dose di radiazione.

Pertanto, è stato eseguito questo studio con l'obiettivo di caratterizzare gli effetti delle radiazioni sul tessuto cutaneo umano e valutare la relazione dose-effetto. È stato utilizzato il costrutto epidermico *SkinEthic<sup>TM</sup>*, sottoposto sia a radiazione con neutroni che a radiazione con fotoni e ne sono stati analizzati gli aspetti morfologici e proliferativi.

Dalle analisi eseguite sui costrutti irraggiati con radiazione neutronica nell'ambito della BNCT, è emerso che il campione è a tutti gli effetti ben rappresentativo degli strati epidermici.

L'analisi morfologica del singolo campione ha infatti permesso di descrivere con precisione e accuratezza quella che è l'effettiva morfologia del tessuto epidermico umano. La colorazione con H&E ha reso possibile descrizioni istoarchitetture e misurazioni dettagliate.

Tuttavia, le sezioni di costrutto analizzate sono risultate estremamente sottili e sensibili ai trattamenti a cui sono state sottoposte, tanto che sono state numerose quelle che, durante i passaggi descritti nel capitolo 4 si sono staccate dal vetrino portaoggetti o risultavano eccessivamente avvolte su loro stesse.

I risultati emersi dalle misurazioni degli spessori e dalle analisi proliferative hanno dimostrato l'elevatissima variabilità tra differenti campioni. Le analisi statistiche confermano l'assenza di differenze statisticamente significative, ad eccezione del picco di positività al secondo giorno di osservazione che si riscontra in alcuni campioni.

Questo significa che le analisi che sono state eseguite in questo studio, su un limitato numero di campioni, andrebbero ripetute su un maggior numero di costrutti, alle stesse condizioni, per verificarne la riproducibilità dei dati, come il picco di positività al secondo giorno di osservazione.

Tuttavia, l'elevata variabilità che caratterizza questo sostituto epidermico potrebbe essere un elemento favorevole per la tipologia di ricerca, nell'ottica traslazionale dell'applicazione clinica, in quanto i campioni risultano maggiormente rappresentativi della variabilità interindividuale.

Potrebbe quindi essere considerata la possibilità di utilizzare un diverso sostituto cutaneo per standardizzare i dati e le procedure e, in seguito, procedere con l'analisi su *SkinEthic™*.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che la radiazione con neutroni in BNCT ha un effetto degradativo superiore alla radiazione con fotoni, come atteso, nonostante sia stato difficile quantificare a priori la dose di radiazione neutronica da somministrare, in quanto strettamente dipendente dalla quantità di boro internalizzato dalle cellule. Inoltre, la quantità di dati è ancora troppo ridotta per avere un confronto attendibile tra le rispettive dosi di radiazioni.

Infine, i dati relativi alla proliferazione cellulare e all'attivazione di meccanismi riparativi mostrano un'elevata variabilità che rende difficile trovare elementi comuni su cui basarsi per un affidabile confronto.

Per l'obiettivo finale del lavoro di costruire una curva NTCP, è auspicabile aumentare il numero di campioni da analizzare da sottoporre a dosi di radiazioni più ravvicinate.

## BIBLIOGRAFIA

- Alrubaiy, L., e K. K. Al-Rubaiy. 2009. «Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications». *Oman Medical Journal* 24 (1): 4–6.
- Altieri, S., S. Bortolussi, P. Bruschi, P. Chiari, F. Fossati, S. Stella, U. Prati, et al. 2008. «Neutron Autoradiography Imaging of Selective Boron Uptake in Human Metastatic Tumours». *Applied Radiation and Isotopes* 66 (12): 1850–55.
- 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): 179–87.
- Bacqueville, D., e A. Mavon. 2009. «Comparative Analysis of Solar Radiation-Induced Cellular Damage between Ex Vivo Porcine Skin Organ Culture and in Vitro Reconstructed Human Epidermis». *International Journal of Cosmetic Science* 31 (4): 293–302.
- Balasubramani, M., T. R. Kumar, e M. Babu. 2001. «Skin Substitutes: A Review». *Burns* 27 (5): 534–44.
- Barth, R. F., P. Mi, e W. Yang. 2018. «Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer». *Cancer Communications* 38: 35.
- Barth, R. F., H. Vicente, O. K Harling, W. S. Kiger, K. J Riley, P. J. Binns, F. M. Wagner, et al. 2012. «Current status of boron neutron capture therapy of high-grade gliomas and recurrent head and neck cancer». *Radiation Oncology (London, England)* 7: 146.
- Barth, R. F., Z. Zhang, e T. Liu. 2018. «A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality». *Cancer Communications* 38: 36.
- Bell, E., H. P. Ehrlich, D. J. Buttle, e T. Nakatsuji. 1981. «Living Tissue Formed in Vitro and Accepted as Skin-Equivalent Tissue of Full Thickness». *Science* 211 (4486): 1052–54.
- Belleghem, S., B. Mahadik, K. Snodderly, e J. P. Fisher. 2020. «2.6.2 - Overview of Tissue Engineering Concepts and Applications». In *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, a cura di William R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, e M. J. Yaszemski, 1289–1316. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00081-7>.
- Benderitter, M., P. Gourmelon, E. Bey, A. Chapel, I. Clairand, M. Prat, e J. J. Lataillade. 2010. «New emerging concepts in the medical management of local radiation injury». *Health Physics* 98 (6): 851–57.
- Bernard, F. X., C. Barrault, A. Deguercy, B. De Wever, e M. Rosdy. 2000. «Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic™ reconstructed human epidermis». *Cell Biology and Toxicology* 16: 391–400.
- Biga, L. M., S. Dawson, A. Harwell, R. Hopkins, J. Kaufmann, M. LeMaster, P. Matern, K. Morrison-Graham, D. Quick, e J. Runyeon. 2019. «5.1 Layers of the Skin». <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>.
- Boelsma, E., M. C. H. Verhoeven, e M. Ponc. 1999. «Reconstruction of a Human Skin Equivalent Using a Spontaneously Transformed Keratinocyte Cell Line (HaCaT)». *Journal of Investigative Dermatology* 112 (4): 489–98.
- Bortolussi, S., I. Postuma, N. Protti, L. Provenzano, C. Ferrari, L. Cansolino, P. Dionigi, et al. 2017. «Understanding the potentiality of accelerator based-boron neutron capture therapy for osteosarcoma: dosimetry assessment based on the reported clinical experience». *Radiation Oncology (London, England)* 12: 130.
- Boyce, S., S. Michel, U. Reichert, B. Shroot, e R. Schmidt. 1990. «Reconstructed Skin from Cultured Human Keratinocytes and Fibroblasts on a Collagen-Glycosaminoglycan Biopolymer Substrate». *Skin Pharmacology and Physiology* 3 (2): 136–43.

- Bucher, N., e C. D. Britten. 2008. «G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer». *British Journal of Cancer* 98 (3): 523–28.
- Burke, J. F., I. V. Yannas, W. C. Quinby, C. C. Bondoc, e W. K. Jung. 1981. «Successful Use of a Physiologically Acceptable Artificial Skin in the Treatment of Extensive Burn Injury». *Annals of Surgery* 194 (4): 413–28.
- Chadha, M., J. Capala, J. Coderre, E. Elowitz, J. Iwai, D. Joel, H. Liu, L. Wielopolski, e A. Chanana. 1998. «Boron Neutron-Capture Therapy (BNCT) for Glioblastoma Multiforme (GBM) Using the Epithermal Neutron Beam at the Brookhaven National Laboratory». *International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics* 40 (4): 829–34.
- Chadwick, J. 1932. «Possible Existence of a Neutron». *Nature* 129 (3252): 312–312.
- Chalkia, M., N. A. Arkoudis, E. Maragkoudakis, S. Rallis, I. Tremi, A. G. Georgakilas, V. Kouloulis, E. Efstathopoulos, e K. Platoni. 2022. «The Role of Ionizing Radiation for Diagnosis and Treatment against COVID-19: Evidence and Considerations». *Cells* 11 (3): 467.
- Choi, H. R., S. Y. Byun, S. H. Kwon, e K. C. Park. 2015. «Niche interactions in epidermal stem cells». *World Journal of Stem Cells* 7 (2): 495–501.
- Danilenko, D. M., G. D. L. Phillips, e D. Diaz. 2016. «In Vitro Skin Models and Their Predictability in Defining Normal and Disease Biology, Pharmacology, and Toxicity». *Toxicologic Pathology* 44 (4): 555–63.
- Dixit, S., D. R. Baganizi, R. Sahu, E. Dosunmu, A. Chaudhari, K. Vig, S. R. Pillai, S. R. Singh, e V. A. Dennis. 2017. «Immunological challenges associated with artificial skin grafts: available solutions and stem cells in future design of synthetic skin». *Journal of Biological Engineering* 11: 49.
- Douglas, B. G. 1982. «Implications of the Quadratic Cell Survival Curve and Human Skin Radiation “Tolerance Doses” on Fractionation and Superfractionation Dose Selection». *International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics* 8 (7): 1135–42.
- Dymova, M. A., S. Y. Taskaev, V. A. Richter, e E. V. Kuligina. 2020. «Boron Neutron Capture Therapy: Current Status and Future Perspectives». *Cancer Communications* 40 (9): 406–21.
- Ehrenfried, A. 1909. «Reverdin and Other Methods of Skin-Grafting». *The Boston Medical and Surgical Journal* 161 (26): 911–17.
- Facy, V., V. Flouret, M. Régnier, e R. Schmidt. 2004. «Langerhans Cells Integrated into Human Reconstructed Epidermis Respond to Known Sensitizers and Ultraviolet Exposure». *Journal of Investigative Dermatology* 122 (2): 552–53.
- Faller, C., M. Bracher, N. Dami, e R. Roguet. 2002. «Predictive Ability of Reconstructed Human Epidermis Equivalents for the Assessment of Skin Irritation of Cosmetics». *Toxicology in Vitro* 16 (5): 557–72.
- Farías, R. O., S. Bortolussi, P. R. Menéndez, e S. J. González. 2014. «Exploring Boron Neutron Capture Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer». *Physica Medica: PM: An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology: Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)* 30 (8): 888–97.
- Fuchs, E., T. Tumber, e G. Guasch. 2004. «Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche». *Cell* 116 (6): 769–78.
- Fukuda, H. 2021. «Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Cutaneous Malignant Melanoma Using 10B-p-Boronophenylalanine (BPA) with Special Reference to the Radiobiological Basis and Clinical Results». *Cells* 10 (11): 2881.

- Gadan, M. A., S. Bortolussi, I. Postuma, F. Ballarini, P. Bruschi, N. Protti, D. Santoro, et al. 2012. «Set-up and calibration of a method to measure <sup>10</sup>B concentration in biological samples by neutron autoradiography». *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 274: 51–56.
- Gallegos-Alcalá, P., M. Jiménez, D. Cervantes-García, e E. Salinas. 2021. «The Keratinocyte as a Crucial Cell in the Predisposition, Onset, Progression, Therapy and Study of the Atopic Dermatitis». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19): 10661.
- Giuggioli, D., M. Sebastiani, M. Cazzato, A. Piaggese, G. Abatangelo, e C. Ferri. 2003. «Autologous skin grafting in the treatment of severe scleroderma cutaneous ulcers: a case report |». *Rheumatology - Oxford Academic* 42 (5): 694–96.
- Guidi, C. 2020. «Irradiation of reconstructed human skin cultivated in-vitro: computational dosimetry and preliminary radiobiological evaluations for BNCT studies». Tesi Magistrale, Pavia: Università degli Studi di Pavia.
- Guiraud, B., H. Hernandez-Pigeon, I. Ceruti, S. Mas, Y. Palvadeau, C. Saint-Martory, N. Castex-Rizzi, H. Duplan, e S. Bessou-Touya. 2014. «Characterization of a human epidermis model reconstructed from hair follicle keratinocytes and comparison with two commercially models and native skin». *International Journal of Cosmetic Science* 36 (5): 485–93.
- Hart, C. E., A. Loewen-Rodriguez, e J. Lessem. 2012. «Dermagraft: Use in the Treatment of Chronic Wounds». *Advances in Wound Care* 1 (3): 138–41.
- Hiratsuka, J., N. Kamitani, R. Tanaka, R. Tokiya, E. Yoden, Y. Sakurai, e M. Suzuki. 2020. «Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT)». *Journal of Radiation Research* 61 (6): 945–51.
- Hirose, K., A. Konno, J. Hiratsuka, S. Yoshimoto, T. Kato, K. Ono, N. Otsuki, et al. 2021. «Boron Neutron Capture Therapy Using Cyclotron-Based Epithelial Neutron Source and Borofalan (<sup>10</sup>B) for Recurrent or Locally Advanced Head and Neck Cancer (JHN002): An Open-Label Phase II Trial». *Radiotherapy and Oncology* 155: 182–87.
- Iddins, C. J., A. L. DiCarlo, M. D. Ervin, E. Herrera-Reyes, e Ronald E. Goans. 2022. «Cutaneous and Local Radiation Injuries». *Journal of radiological protection: official journal of the Society for Radiological Protection* 42 (1): 10.1088/1361-6498/ac241a.
- Jones, I., L. Currie, e R. Martin. 2002. «A Guide to Biological Skin Substitutes». *British Journal of Plastic Surgery* 55 (3): 185–93.
- Jones, P.A., A.V. King, L.K. Earl, e R.S. Lawrence. 2003. «An Assessment of the Phototoxic Hazard of a Personal Product Ingredient Using in Vitro Assays». *Toxicology in Vitro* 17 (4): 471–80.
- Kandárová, H., M. Liebsch, H. Spielmann, E. Genschow, E. Schmidt, D. Traue, R. Guest, et al. 2006. «Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for in Vitro Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431». *Toxicology in Vitro* 20 (5): 547–59.
- Kankaanranta, L., T. Seppälä, H. Koivunoro, K. Saarilahti, T. Atula, J. Collan, E. Salli, et al. 2012. «Boron Neutron Capture Therapy in the Treatment of Locally Recurred Head-and-Neck Cancer: Final Analysis of a Phase I/II Trial». *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics* 82 (1): e67–75.
- Kohlhauser, M., H. Luze, S. P. Nischwitz, e L. P. Kamolz. 2021. «Historical Evolution of Skin Grafting—A Journey through Time». *Medicina* 57 (4): 348.

- Kono, T., Y. Miyachi, e M. Kawashima. 2021. «Clinical Significance of the Water Retention and Barrier Function-Improving Capabilities of Ceramide-Containing Formulations: A Qualitative Review». *The Journal of Dermatology* 48 (12): 1807–16.
- Koster, M., e D. R. Roop. 2004. «The role of p63 in development and differentiation of the epidermis: Tanioku Kihei memorial lecture». *Journal of Dermatological Science* 34 (1): 3–9.
- Lamba, M., A. Goswami, e A. Bandyopadhyay. 2021. «A Periodic Development of BPA and BSH Based Derivatives in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)». *Chemical Communications* 57 (7): 827–39.
- Langer, R. 2000. «Tissue Engineering». *Molecular Therapy* 1 (1): 12–15.
- Langer, R., e J. P. Vacanti. 1993. «Tissue Engineering». *Science* 260 (5110): 920–26.
- Lee, T., e A. Friedman. 2016. «Skin Barrier Health: Regulation and Repair of the Stratum Corneum and the Role of Over-the-Counter Skin Care». *Journal of Drugs in Dermatology*, n. 1049. <https://jddonline.com/articles/skin-barrier-health-regulation-and-repair-of-the-stratum-corneum-and-the-role-of-over-the-counter-sk-S1545961616P1047X/>.
- Livingstone, L R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks, e T. D. Tlsty. 1992. «Altered Cell Cycle Arrest and Gene Amplification Potential Accompany Loss of Wild-Type P53». *Cell* 70 (6): 923–35.
- Locher, G. 1936. «Biological effects and therapeutic possibilities of neutron». *American journal of roentgenology*, 1–13.
- Losquadro, W. D. 2017. «Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer». *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 25 (3): 283–89.
- Macfarlane, M., P. Jones, C. Goebel, E. Dufour, J. Rowland, D. Araki, M. Costabel-Farkas, et al. 2009. «A Tiered Approach to the Use of Alternatives to Animal Testing for the Safety Assessment of Cosmetics: Skin Irritation». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54 (2): 188–96.
- Malouff, T. D., D. S. Seneviratne, D. K. Ebner, William C. Stross, M. R. Waddle, D. M. Trifiletti, e S. Krishnan. 2021. «Boron Neutron Capture Therapy: A Review of Clinical Applications». *Frontiers in Oncology* 11: 601820.
- Martini, Frederic H., Robert B. Tallitsch, J. L. Nath, e Michael J. Timmons. 2012. *Anatomia umana*. EdiSES.
- Mazzoleni, G., D. Di Lorenzo, e N. Steimberg. 2009. «Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?» *Genes & Nutrition* 4 (1): 13–22.
- Medina, J., C. Elsaesser, V. Picarles, O. Grenet, M. Kolopp, S. D. Chibout, e A. de Brugerolle de Fraissinette. 2001. «Assessment of the Phototoxic Potential of Compounds and Finished Topical Products Using a Human Reconstructed Epidermis». *In Vitro & Molecular Toxicology* 14 (3): 157–68.
- Menéndez, P. R., B. M. C. Roth, M. D. Pereira, M. R. Casal, S. J. González, D. B. Feld, G. A. Santa Cruz, et al. 2009. «BNCT for Skin Melanoma in Extremities: Updated Argentine Clinical Results». *Applied Radiation and Isotopes* 67 (7, Supplement): S50–53.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop, e A. Bradley. 1999. «P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis». *Nature* 398 (6729): 708–13.
- Mishima, Y., M. Ichihashi, S. Hatta, C. Honda, K. Yamamura, e T. Nakagawa. 1989. «New Thermal Neutron Capture Therapy for Malignant Melanoma: Melanogenesis-Seeking

- 10B Molecule-Melanoma Cell Interaction From In Vitro to First Clinical Trial». *Pigment Cell Research* 2 (4): 226–34.
- Miyatake, S. I., S. Kawabata, R. Hiramatsu, T. Kuroiwa, M. Suzuki, e K. Ono. 2018. «Boron Neutron Capture Therapy of Malignant Gliomas». *Progress in Neurological Surgery* 32: 48–56.
- Miyatake, S. I., M. Wanibuchi, N. Hu, e K. Ono. 2020. «Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors». *Journal of Neuro-Oncology* 149 (1): 1–11.
- Nascimento Pedrosa, T. do, C. M. Catarino, P. Pennacchi, S. B. de Moraes Barros, e S. Maria-Engler. 2021. «Skin Equivalent Models: Protocols for In Vitro Reconstruction for Dermal Toxicity Evaluation». In *Toxicity Assessment: Methods and Protocols*, a cura di C. M. M. Palmeira, D. P. de Oliveira, e D. Dorta Junqueira, 31–41. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6_3).
- Nedunchezian, K., N. Aswath, M. Thiruppathy, e S. Thirugnanamurthy. 2016. «Boron Neutron Capture Therapy - A Literature Review». *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 10 (12): ZE01–4.
- Netzlaff, F., C. M. Lehr, P. W. Wertz, e U. F. Schaefer. 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*, Selected papers of the 5th International Conference and Workshop on Cell Culture, 60 (2): 167–78.
- Passeron, T., J. C. Valencia, C. Bertolotto, T. Hoashi, E. Le Pape, K. Takahashi, R. Ballotti, e V. J. Hearing. 2007. «SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (35): 13984–89.
- Pellevoisin, C., C. Videau, D. Briotet, C. Grégoire, C. Tornier, A. Alonso, A. S. Rigaudeau, C. Bouez, e N. Seyler. 2018. «SkinEthic™ RHE for in Vitro Evaluation of Skin Irritation of Medical Device Extracts». *Toxicology in Vitro* 50: 418–25.
- Pinelli, T., A. Zonta, S. Altieri, P. Pedroni, P. Bruschi, P. Chiari, C. Ferrari, et al. s.d. «La cura delle metastasi epatiche diffuse mediante il metodo TAOrMINA». *La Fisica nella Scuola* XXXVI: 150–55.
- Pitto-Barry, A. 2021. «Polymers and Boron Neutron Capture Therapy (BNCT): A Potent Combination». *Polymer Chemistry* 12 (14): 2035–44.
- Postuma, I., S. Bortolussi, N. Protti, F. Ballarini, Piero Bruschi, L. Ciani, S. Ristori, et al. 2016. «An improved neutron autoradiography set-up for 10B concentration measurements in biological samples». *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 21 (2): 123–28.
- Postuma, I., S. Gonzalez, M. S. Herrera, L. Provenzano, M. Ferrarini, C. Magni, N. Protti, et al. 2021. «A Novel Approach to Design and Evaluate BNCT Neutron Beams Combining Physical, Radiobiological, and Dosimetric Figures of Merit». *Biology* 10 (3).
- Proksch, E., J. M. Brandner, e J. M. Jensen. 2008. «The Skin: An Indispensable Barrier». *Experimental Dermatology* 17 (12): 1063–72.
- Provenzano, L., M. S. Olivera, G. Saint Martin, L. M. Rodríguez, D. Fregenal, S. I. Thorp, E. C. C. Pozzi, et al. 2018. «Extending Neutron Autoradiography Technique for Boron Concentration Measurements in Hard Tissues». *Applied Radiation and Isotopes* 137: 62–67.
- Pruniéras, M., M. Régnier, e D. Woodley. 1983. «Methods for Cultivation of Keratinocytes with an Air-Liquid Interface». *Journal of Investigative Dermatology* 81 (1): S28–33.

- Przekora, A. 2020. «A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro?» *Cells* 9 (7): 1622.
- Rheinwald, J. G., e H. Green. 1975. «Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies from Single Cell Is». *Cell* 6 (3): 331–43.
- Rosdy, M., e L. C. Clauss. 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): 409–14.
- Santivasi, W. L., e F. Xia. 2014. «Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair». *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (2): 251–59.
- Satoshi, T., M. Wanibuchi, S. Kawabata, K. Takeuchi, Y. Sakurai, M. Suzuki, K. Ono, e Miyatake. 2021. «Reactor-based boron neutron capture therapy for 44 cases of recurrent and refractory high-grade meningiomas with long-term follow-up». *Neuro Oncology* 24 (1): 90–98.
- Schäfer-Korting, M., U. Bock, W. Diembeck, H. J. Düsing, A. Gamer, E. Haltner-Ukomadu, C. Hoffmann, et al. 2008. «The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study». *Alternatives to Laboratory Animals* 36 (2): 161–87.
- Selden, C., e B. Fuller. 2018. «Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design». *Bioengineering* 5 (2): 32.
- Semlin, L., M. Schäfer-Korting, C. Borelli, e H. C. Korting. 2011. «In Vitro Models for Human Skin Disease». *Drug Discovery Today* 16 (3): 132–39.
- Shakespeare, P. G. 2005. «The Role of Skin Substitutes in the Treatment of Burn Injuries». *Clinics in Dermatology* 23 (4): 413–18.
- Stark, H. J., M. J. Willhauck, N. Mirancea, K. Boehnke, I. Nord, D. Breitkreutz, A. Pavesio, P. Boukamp, e N. E. Fusenig. 2004. «Authentic Fibroblast Matrix in Dermal Equivalents Normalises Epidermal Histogenesis and Dermo-Epidermal Junction in Organotypic Co-Culture». *European Journal of Cell Biology* 83 (11): 631–45.
- Stewart, F. A., A. V. Akleyev, M. Hauer-Jensen, J. H. Hendry, N. J. Kleiman, T. J. Macvittie, B. M. Aleman, et al. 2012. «ICRP Publication 118: ICRP Statement on Tissue Reactions and Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs—Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context». *Annals of the ICRP* 41 (1–2): 1–322.
- Suzuki, M. 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.
- Sweet, W. H., A. H. Soloway, e G. L. Brownell. 2009. «Boron-Slow Neutron Capture Therapy of Gliomas». *Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology* 1 (2): 114–21.
- Vacanti, J. P., e R. Langer. 1999. «Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation». *The Lancet* 354: S32–34.
- Vig, K., A. Chaudhari, S. Tripathi, S. Dixit, R. Sahu, S. Pillai, V. A. Dennis, e S. R. Singh. 2017. «Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 789.

- 
- Ward, J. F. 1988. «DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation and Reparability». *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 35: 95–125.
- Watt, F. M. 1998. «Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate.» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353 (1370): 831–37.
- Wong, R., S. Geyer, W. Weninger, J. C. Guimberteau, e J. K. Wong. 2016. «The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin». *Experimental Dermatology* 25 (2): 92–98.
- Young, B., J. S. Lowe, A. Stevens, e J. W. Heath. s.d. *Istologia e anatomia microscopica - Wheater*. Quinta. Elsevier.
- Yousef, H., M. Alhajj, e S. Sharma. 2022. «Anatomy, Skin (Integument), Epidermis». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>.
- Zaulyanov, L., e R. S. Kirsner. 2007. «A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers». *Clinical Interventions in Aging* 2 (1): 93–98.

## SITOGRAFIA

«Health Protection Agency. High Dose Radiation Effects and Tissue Injury: Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation» 2009. 2009.

«SkinEthic RHE Reconstructed Human Epidermis». s.d. <https://www.episkin.com/SkinEthic-RHE>.

«Tissue Engineering and Regenerative Medicine». s.d. Consultato 10 marzo 2022. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine#pid-1166>.

## **RINGRAZIAMENTI**

Alla mia relatrice, la Dottoressa Federica Riva, va il mio ringraziamento più grande. Sono entrata per la prima volta nel suo laboratorio in preda alla disperazione e, come spesso succede, è stata la cosa migliore che mi potesse capitare. Frequentare il laboratorio di Istologia ed Embriologia Sperimentale mi ha permesso di crescere professionalmente e umanamente. Ho imparato tutto quello che so con grande serietà ma ho anche vissuto momenti di grande umanità e divertimento. Porterò per sempre con me le esperienze che abbiamo condiviso, saranno la motivazione che mi spingerà a dare sempre il massimo e a continuare per la mia strada che finalmente ho trovato. È la mia ispirazione e il mio esempio e non la ringrazierò mai abbastanza.

Grazie alla Professoressa Silva Bortolussi e al Dottor Ian Postuma per l'estrema gentilezza e professionalità e per avermi dato la possibilità di entrare nella famiglia BNCT. Far parte di questo progetto mi ha aperto la porta al futuro e a una nuova grandissima esperienza che aspetta solo di essere vissuta.

Ringrazio la Dottoressa Laura Cansolino e la Dottoressa Cinzia Ferrari per la grande disponibilità, per avermi appoggiata e aver creduto nelle mie capacità.

Un doveroso ringraziamento alla Dottoressa Cristina Monti, per avermi aiutata ad orientarmi nella biostatistica, aspetto fondamentale di questa tesi.

Grazie al caro Professor Alberto Calligaro per la maestria con cui mi ha insegnato ad usare il microscopio. Porterò per sempre con me i suoi insegnamenti, ogni momento vissuto insieme è stato una lezione da cui imparare qualcosa e un'occasione per ridere alle sue battute sempre pronte.

Grazie ad Aurora Farina per la pazienza con cui mi ha insegnato le nozioni pratiche degli esperimenti su cui poggia la mia tesi.

A mia mamma Silvana, che ha reso possibile tutto questo e senza la quale non sarei dove sono. Supporto costante e mia prima sostenitrice. Grazie per avermi trasmesso la costanza e la tenacia nel lavoro che si ama e a tenere duro anche nei momenti più complicati.

Ringrazio di cuore la Dottoressa Elena Delgrosso. Collega e amica preziosissima, sempre presente nonostante la distanza e sempre pronta con le parole giuste anche nei giorni più difficili. I racconti sulle nostre esperienze davanti a innumerevoli aperitivi sono il motivo per cui ho capito di aver trovato una grande amica, da sfidare a colpi di scommesse. Anche se non reggerò mai tanti spritz quanto lei.

Grazie ai miei compagni Francesco ed Elena. Sono felice di aver condiviso con voi le giornate in laboratorio, tra esperimenti, sedute al microscopio e giornate davanti al pc. Grazie per il supporto, la compagnia, le risate e per i nostri adorati pranzi all'aperto.

Un ringraziamento alle mie compagne di corso Jasmine e Marianna. Frequentare l'Università durante una pandemia non è certo stato facile, ma grazie alla vostra compagnia questi due anni sono volati.

E ultimi, ma di certo non per importanza, i miei carissimi amici: ringrazio Giulia, Arianna, Manuel, Giulia, Monica e Stefania. Grazie per i momenti spensierati passati insieme. La vostra compagnia è insostituibile e niente mi fa star bene come stare insieme a voi. Siete la mia seconda famiglia e so di poter contare sempre su di voi.