

Trieste 21.07.2021

Regione autonoma Friuli Venezia Giulia
**Direzione centrale salute , integrazione
socio-sanitaria, politiche sociali e famiglia**
Riva Nazario Sauro, 8
34124 Trieste
PEC: salute@certregione.fvg.it

Ogg:

Ricerca clinica, traslazionale, di base, epidemiologica e organizzativa, di cui all'articolo 15, comma 2, lettera b), della legge regionale 17/2014,

Progetto BioMEC Relazione di Finale 21.07.2021

Il progetto BioMEC, Applicazione delle tecnologie biomeccaniche a integrazione delle metodiche convenzionali nel contesto ospedaliero, ha come obiettivo la dimostrazione delle potenzialità dell'approccio biomeccanico in medicina attraverso 2 linee progettuali in collaborazione con 2 istituti ospedalieri.

1) Lo studio delle proprietà meccaniche degli ovociti nell'ambito della fertilizzazione in-vitro – ICSI, la determinazione della correlazione tra le proprietà meccaniche e il successo della fertilizzazione e infine la progettazione e la realizzazione di un prototipo di cell sorter per la selezione degli ovociti adatti alla pratica ICSI.

2) Lo studio delle proprietà meccaniche di tessuti tumorali primari del seno per raffinare diagnosi e prognosi del tumore, la definizione delle patologie e/o le situazioni border line in cui l'indagine biomeccanica può essere utile alla definizione della diagnosi e delle opportune terapie, ed infine la realizzazione di un prototipo di indentatore meccanico da utilizzare nell'ambito della anatomia patologica ospedaliera.

I risultati ottenuti nell'ambito del progetto serviranno a definire i protocolli traslazionali utili a trasferire gli approcci biomeccanici utilizzati in laboratorio nell'ambito del progetto alle realtà ospedaliere regionali e ad alimentare la ricaduta occupazionale sulle realtà industriali esistenti coinvolte ed eventuali nuove realtà industriali create per lo sviluppo e la commercializzazione dei prototipi.

Le attività definite all'interno del progetto erano le seguenti:

- I. Studio della meccanica degli ovociti umani in funzione dell'età e della fase di maturazione. (MO)
- II. Studio, in animale, del rapporto tra le proprietà meccaniche degli ovociti e il successo della procedura di fertilizzazione in vitro. (MA)
- III. Realizzazione di un dispositivo microfluidico per la selezione cellulare secondo dimensione e proprietà meccaniche, e successivo utilizzo delle stesse per la fecondazione in vitro. (DMF)
- IV. Validazione del DMF su un modello animale (V1)
- V. Definizione dei protocolli per la definitiva traslazione dei risultati ottenuti in laboratorio alla pratica clinica. (P1)
- VI. Studio delle proprietà meccaniche di tessuti tumorali prelevato da paziente (biopsie) in correlazione alla natura e allo stato di maturazione del tumore al seno. (MT)
- VII. Identificazione di eventuali patologie in cui le proprietà meccaniche sono positivamente correlate e utili ad affinare diagnosi e prognosi. (DT)

- VIII. Progettazione e realizzazione di un dispositivo automatizzato per valutare la rigidità del tessuto (DMM)
- IX. Definizione dei protocolli per la definitiva traslazione dei risultati ottenuti in laboratorio alla pratica clinica. (P2)

In particolare, sono stati individuati i seguenti *deliverable*:

Obiettivo Specifico	Risultato Atteso	Indicatore di valutazione	Fonte di Verifica
1. Sviluppo di un protocollo per la misura delle proprietà meccaniche degli ovociti	Correlazione tra proprietà meccaniche degli ovociti e grado di maturazione	Test a doppio cieco in cui tra proprietà meccaniche e morfologiche	Analisi statistica del test a doppio cieco
2. Identificazione del modello animale e misura dell'influenza delle misure mecano biologica sul rate di successo della fertilizzazione	Dimostrazione della non influenza delle misure biomeccaniche sull'esito del processo di fertilizzazione	Il rate di successo di fertilizzazione in vitro tra ovociti misurati e non misurati è statisticamente indistinguibile	Analisi statistica del successo della fertilizzazione, valutato alla nascita, su modello animale.
3. analisi della correlazione tra lo stato anagrafico e clinico del donatore di ovocita e proprietà meccaniche degli ovociti	Identificazione di situazioni anagrafiche/cliniche con spettro biomeccanico anomalo.	La proprietà biomeccaniche di ciascun ovocita di una stessa paziente cadono tutte al di fuori della distribuzione normale delle stesse.	Analisi numerica
4. Ottimizzazione di tecniche di misure meccaniche con microscopia a forza atomica. Normalizzazione di dati di forza rispetto al tessuto sano.	Automatizzazione della misura delle mappe di distribuzione di rigidità e normalizzazione delle stesse	Riproducibilità delle misure. Test su campioni a rigidità nota.	Trattamento statistico dei dati.
5. Misure "blind" delle proprietà meccaniche di fettine di tessuto biotico da pazienti con cancro al seno a diversi stadi di malattia	Mappe di distribuzione di rigidità nei tessuti biotici	Correlazione tra mappa di rigidità delle fettine e stato di progressione della malattia.	Verifica con tecniche di stadiazione istologica del grado di sviluppo del tumore

RISULTATI:

1) attività di progetto

I. Sviluppo delle metodologie per lo studio di ovociti umani soprannumerari e animali

La misura delle proprietà meccaniche del singolo ovocita, umano e animale, può essere affrontata con diversi approcci metodologici. Gli aspetti più importanti sono che la manipolazione non deve essere invasiva, e quindi deve essere sensibile a forze molto basse in quanto l'ovocita deve mantenere intatte tutte le sue qualità al fine di poter diventare embrione prima e uomo/animale dopo, e la distinguibilità e tracciabilità dell'ovocita misurato in modo da poterlo fecondare e impiantare senza tema di errori di scambio. Fate queste considerazioni le uniche tecniche che possono ragionevolmente soddisfarle entrambe sono l'aspirazione tramite micro pipetta e l'indentazione tramite AFM. La prima però comporta deformazioni superiori al 10% la seconda consente solo la misura delle proprietà meccaniche superficiali.

Si è quindi scelto di sviluppare le metodologie per la tecnica AFM in quanto meno invasiva e potenzialmente capace di fornire informazioni più articolate.

In una prima fase ci si è concentrati sullo studio delle proprietà di ovociti umani e sulla correlazione dei risultati con il successo della pratica della fecondazione in vitro, avendo osservato una potenziale correlazione tra proprietà meccaniche e fertilità. Tali risultati, ottenuti e pubblicati prima dell'inizio del presente progetto, sono stati confermati da ulteriori esperimenti svolti nel contesto del progetto. A questo scopo sono stati utilizzati ovociti soprannumerari donati, con il consenso informato, da pazienti in cura per problemi di infertilità, e che per ragioni personali hanno scelto di non congelare gli ovociti in soprannumero. Le misure sono state eseguite con un microscopio a forza atomica commerciale (Nanowizard II – JPK, Berlin, D), ottimizzando i parametri rilevanti e mettendo a punto una tecnica specifica per la realizzazione di sonde sferiche dal diametro noto e omogeneo. I dati sono stati analizzati con un algoritmo sviluppato appositamente per tenere conto delle differenti proprietà della zona esterna della zona pellucida, che presenta una struttura irregolare e frastagliata, come anche evidenziato in microscopia elettronica, e la parte più interna e più compatta. (figura 1)

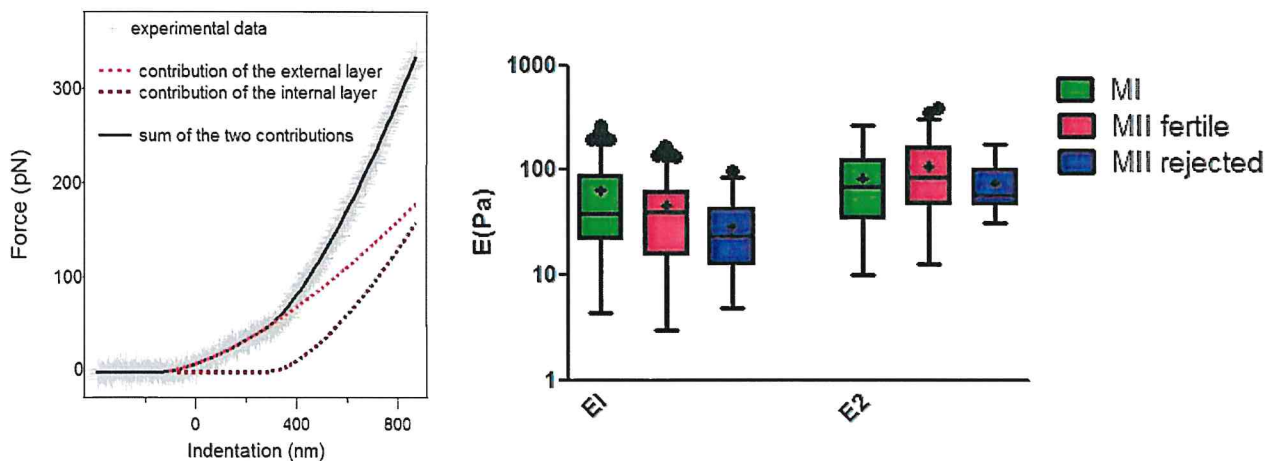


Figura 1. Andamento delle misure di indentazione con due pendenze e valori di due moduli di Young in funzione della fase di maturazione degli ovociti.

Al fine di assegnare con maggior precisione i valori misurati alle diverse parti dell'ovocita, e in particolare per escludere che alle maggiori indentazioni potesse essere presente anche un contributo dello spazio perivitellino o dell'ooplasma, è stato sviluppato un sistema ottico in grado di rilevare la profondità della indentazione nel caso dei due regimi evidenziati in Figura 1. I risultati sono riportati in figura 2. Sono stati ottenuti su ovociti murini, con la metodologia descritta nel prossimo paragrafo, ma possono essere applicati anche al modello umano.

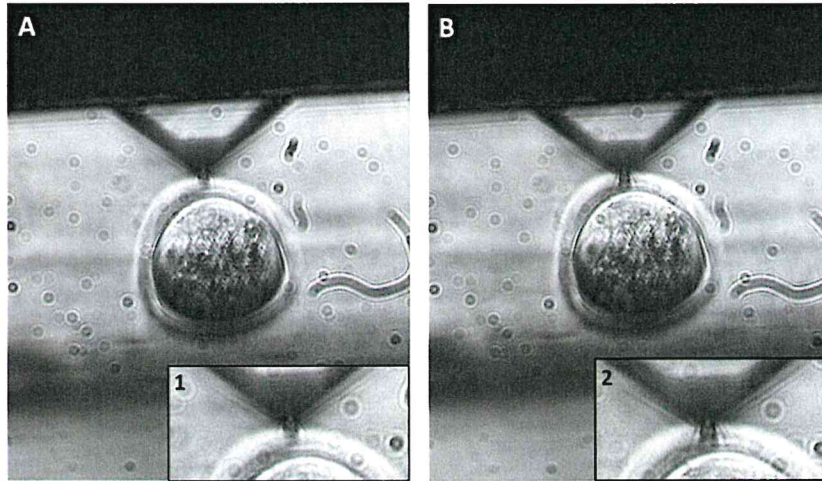


Figura 2. vista laterale di un ovocita indentedo da un cantilever triangolare su cui è stata incollata una sfera di polistirene di 5 μ m di diametro, usata per la indentazione. A) la posizione di contatto; B) massima di indentazione. Si osserva che anche a seguito della massima indentazione non si genera alcuna deformazione dello spazio perivitellino e dell'ooplasm. Da questa evidenza si conclude che entrambi i moduli di Young misurati sono relativi alla Zona pellucida.

Analisi al microscopio elettronico a scansione hanno infine evidenziato come la struttura disomogenea e spugnosa dello strato esterno della zona pellucida potrebbe essere la causa della riduzione del modulo di Young nella prima parte della curva di indentazione. La figura 3, pannelli A e B, mostrano una immagine al microscopio elettronico di un ovocita congelato, in cui la struttura della zona pellucida è evidenziata. Misure ripetute in posizioni diverse sullo stesso ovocita (Figura 3C e 3D) hanno infine mostrato una variabilità dei valori di E1 da un to a punto maggiore della variabilità tra diversi ovociti. Al contrario misure di E2 da un to a punto si sono mostrate molto più uniformi e con una variabilità inferiore a quella evidenziata tra ovociti differenti.

Per questa ragione nelle misure riportate nel seguito per la valutazione dell'invecchiamento dell'ovocita, è stata presa in considerazione solo il valore di E2.

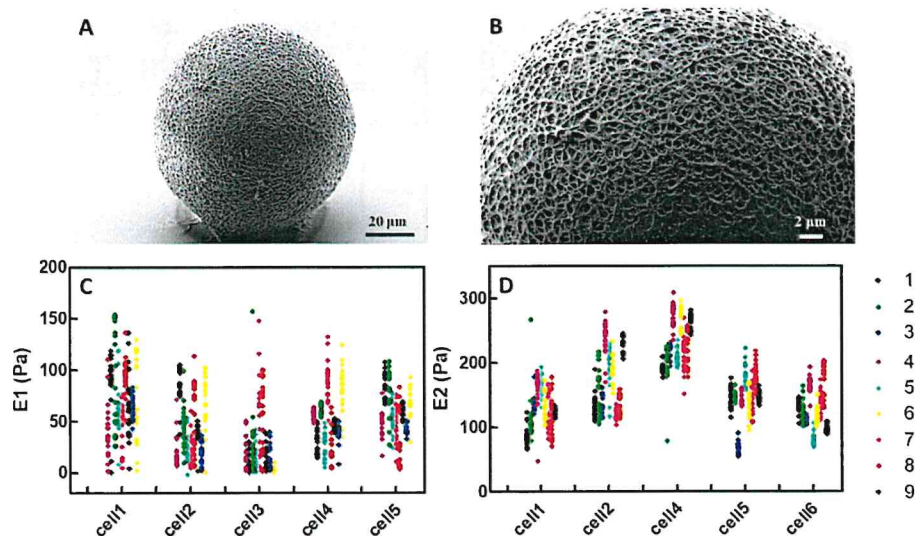


Figura 3. (A,B) Immagini al cryo SEM dell'ovocita che evidenziano la rete porosa della distribuzione dei valori di ZP (C) E1 all'interno della stessa cellula è maggiore della distribuzione dei valori su cellule diverse e non consentono di apprezzare posizione ed eterogeneità cellulare; (D) La distribuzione dei valori E2 all'interno della stessa cella è sufficientemente piccola che la distribuzione dei valori non cambia in base all'area sondata e si può apprezzare la differenza tra i valori medi delle singole celle

La stessa metodologia è stata applicata per verificare l'effetto delle tecniche di crioconservazione sulle proprietà meccaniche degli ovociti. A questo scopo lo stesso ovocita umano soprannumerario, è stato misurato, congelato, mantenuto a 77K per un ora, scongelato e nuovamente misurato. Congelamento e scongelamento sono stati effettuati seguendo i protocolli standard utilizzati in embriologia.

Dagli esperimenti effettuati non è emersa nessuna anomalia introdotta dalle pratiche di congelamento su ovociti sani. E' stato invece evidenziato che ovociti che mostrano moduli di elasticità tipici di ovociti in fase di degradazione non evidenziabile dalla ispezione visuale, vengono ulteriormente degradati dal processo di congelamento, confermando il carattere predittivo della misura biomeccanica.

Al fine di espandere il numero di parametri utili alla caratterizzazione e alla scelta degli ovociti si è deciso di indagare anche le proprietà viscoelastiche del citoplasma dell'ovocita, utilizzando l'AFM in modalità microstretch plate. Per fare ciò è stato necessario progettare e fabbricare degli opportuni cantilever, di dimensioni e geometria tali da poter comprimere l'ovocita con forza uniforme e uniaxiale.

Lo schema del cantilever realizzato e del suo montaggio sul supporto AFM sono riportati in Figura 2.

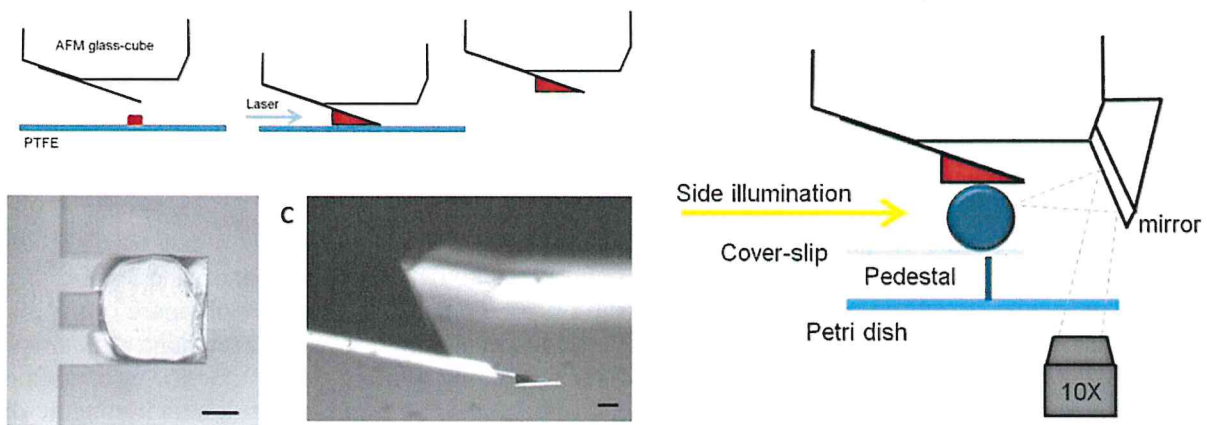


Fig. 4 Cantilever micro fabbricato per compressione uni assiale e schema di applicazione della misura.

Sono state effettuate misure preliminari della forza di compressione e dei tempi di rilassamento della forza a posizione costante. Quest'ultimo tempo caratteristico è dato dal rapporto del modulo elastico e del coefficiente di viscosità. Anche in questo caso sono state evidenziati due regimi, uno dominato dalle proprietà elastiche della zona pellucida e uno dominato dalle proprietà viscosi del citoplasma. Queste misure non hanno tuttavia evidenziato una dipendenza dal grado di maturazione dell'ovocita. In Figura 2 sono riportati i dati dei due tempi caratteristici per ovociti umani immaturi, maturi e degradati, secondo la classificazione ottica tradizionale. Il metodo proposto è stato descritto in un manoscritto che è in preparazione per la pubblicazione.

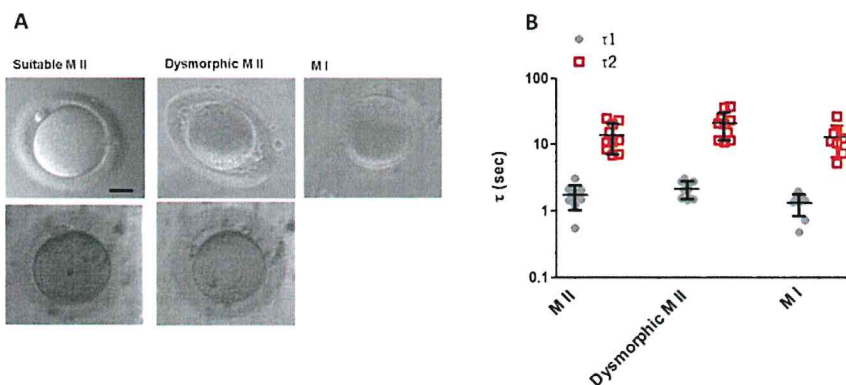


Fig. 5 Risultati delle misure di rilassamento su ovociti umani.

II. Identificazione e sviluppo del modello animale.

Allo scopo di valutare gli effetti della valutazione biomeccanica degli ovociti si è scelto di sperimentarne l'effetto su un modello murino. La scelta è motivata dalla abbondanza di ovociti prodotti dal topo e dai rapidi tempi di gestazione che permetteranno una valutazione statisticamente rilevante nei tempi del progetto.

Gli esperimenti sono stati effettuati su topi C57BL/6, una linea ottimizzata per le capacità riproduttive. Due differenti stimoli ormonali vengono iniettati nel topo prima del prelievo. Il primo (48h prima del prelievo), pregnant mare's gonadotropin serum (PMSG) induce l'ovulazione, il secondo human chorionic gonadotropin (hCG) favorisce l'eventuale sviluppo embrionale successivo. A distanza di 15h dalla seconda iniezione il topo viene sacrificato tramite dislocazione cervicale e gli ovociti, in numero variabile tra 15 e 30, vengono prelevati dagli ovidotti. La procedura di prelievo viene effettuata in una petri da 100 mm in una goccia di terreno (MEM con l'aggiunta di HEPES) sotto olio minerale, con uno stereomicroscopio. I successivi passaggi di pulizia degli ovociti vengono sempre effettuati in gocce di terreno sotto olio minerale. Per la pulizia degli ovociti dalle cellule della corona radiata, i cumuli vengono messi (per non più di 3-4 min) in una soluzione contenente Ialuronidasi, un enzima che agisce degradando l'acido ialuronico di cui è composto il complesso del cumulo. Durante il trattamento enzimatico le cellule vengono trattate (aspirazione ed espulsione ripetute) con delle flexipet da 100 micron (i capillari hanno un diametro interno leggermente superiore alle dimensioni della cellula). Vengono quindi fatti dei passaggi in gocce di terreno pulito e successivamente ancorate sui supporti per le misure. Nel caso in cui sia necessario tenere le cellule in incubatore, viene utilizzato lo stesso terreno non tamponato (con l'aggiunta di bicarbonato di sodio).

Gli ovociti così ottenuti sono stati esaminati al microscopio a forza atomica, utilizzando il protocollo sviluppato per gli ovociti umani.

A questo scopo, essendo le proprietà della zona pellucida differenti nell'uomo e nel topo, in quanto quest'ultimo manca di una delle quattro glicoproteine presenti nell'ovocita umano, e questa differenza comporta una minore adesione dell'ovocita al substrato, è stato necessario sviluppare un substrato micopatternato in grado di immobilizzare l'ovocita consentendo al tempo stesso l'esecuzione delle misure di forza. I substrati sono stati realizzati tramite tecnica di micromolding printing su substrato in vetro, utilizzando un polimero commerciale trasparente e biocompatibile, Ormocomp®. La figura 4 riporta una immagine di due ovociti murini immobilizzati sul substrato micopatternato.

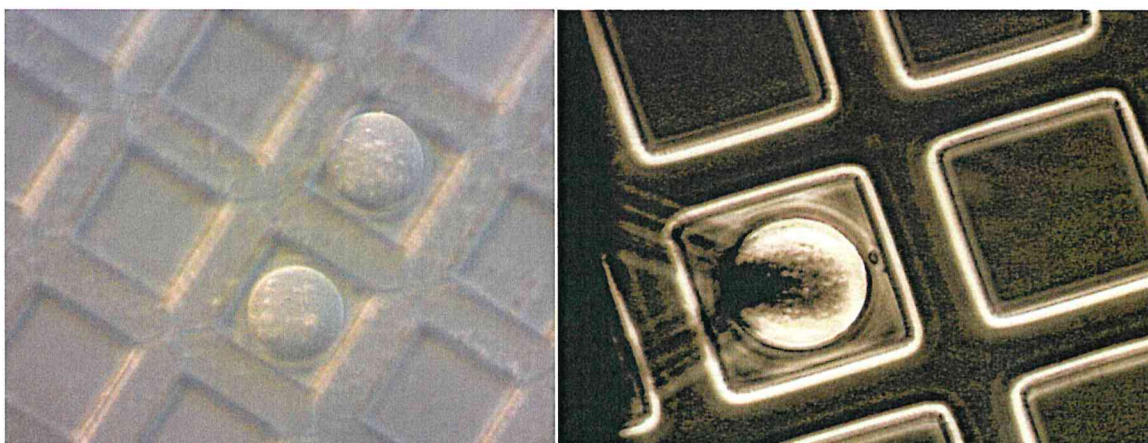


Figura 6. Ovociti murini intrappolati nel substrato e sotto la sonda AFM micropatternato realizzato in Ormocomp®.

Utilizzando le procedure di pulizia sopra descritte e i substrati realizzati è stato possibile realizzare la misura delle proprietà biomeccaniche degli ovociti murini. Anche nel caso degli ovociti murini è possibile individuare due valori di modulo di Young (rigidità) associati alla arte più esterna e frastagliata della ZP e a quella più interna, e valori di modulo di Young osservati sono compatibili con i valori misurati su campioni umani (Figura 5). Ovviamente nel caso dei topi, dato il metodo di recupero degli ovociti e la "giovane" età delle "donatrici", tutti gli ovociti ottenuti sono al corretto stadio di maturazione e non presentano segni di invecchiamento, per cui i dati risultano più omogenei.

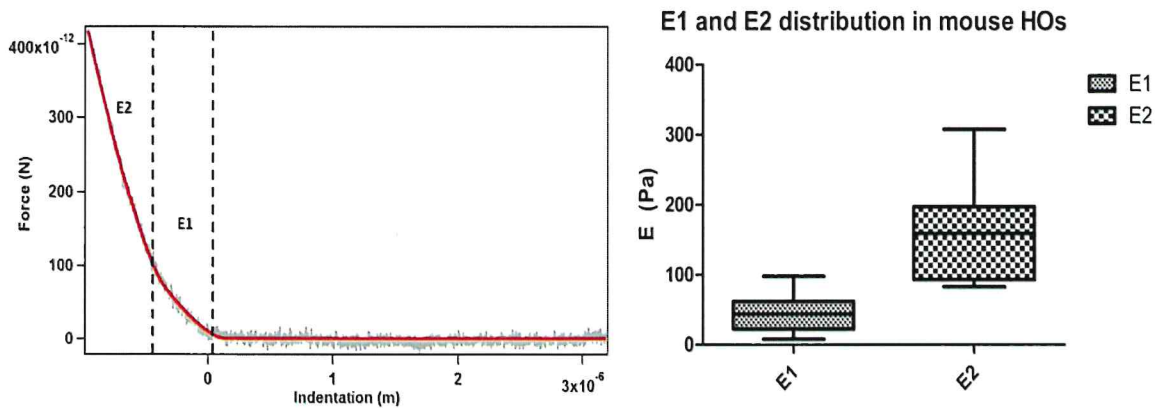


Figura 7. Distribuzione del modulo di Young degli ovociti murini.

III. Valutazione dell'invecchiamento post-impianto dell'ovocita.

Allo scopo di simulare il processo di invecchiamento degli ovociti murini, sono state effettuate misure in funzione del tempo trascorso in incubatore dal momento del prelievo e dalla pulizia. L'obiettivo di questa parte del lavoro è quello di stabilire un protocollo atto alla valutazione dello stato di maturazione dell'ovocita al momento della fecondazione e alla selezione per il successivo impianto. Di fatto non esistono metodi non invasivi che possano dare indicazioni sul tempo trascorso dall'ingresso in fase MII, mentre esiste una forte evidenza sperimentale in letteratura che questo rivesta una notevole importanza nel determinare il successo della pratica di fecondazione. L'identificazione di un protocollo trasferibile in clinica per la selezione degli ovociti più idonei sarebbe di grande aiuto nel migliorare la resa del processo di IVF.

Allo scopo di aumentare la statistica e ridurre il numero di animali sacrificato è stata valutata la possibilità di utilizzare ovociti congelati. La figura 6 mostra il confronto dei risultati tra ovociti murini freschi e crioconservati. I risultati non mostrano differenze significative, e confermano quanto già emerso dagli esperimenti effettuati su ovociti umani.

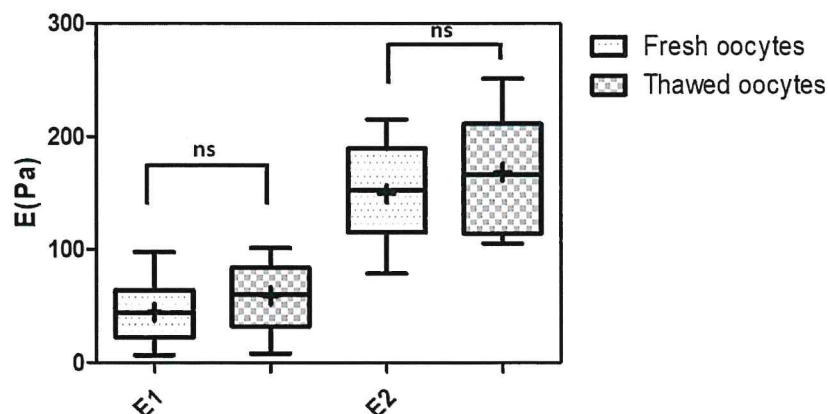


Figura 8. Confronto tra le proprietà meccaniche di ovociti freschi e scongelati

Successivamente è stato verificato che le stesse misure di indentazione non possano influenzare il processo stesso di deterioramento dell'ovocita. Sono state quindi effettuate indentazioni a forze crescenti ed è quindi stato valutato il tempo trascorso dal recupero dell'ovocita all'ingresso in una fase apoptotica dello stesso, in base ad una valutazione visiva. I risultati sono riportati in figura 7. Non è stata evidenziata nessuna inferenza della misura di indentazione nanomeccanica sul naturale processo degradativo dell'ovocita. Per precauzione si è comunque stabilito di effettuare le successive misure utilizzando una forza massima di 1nN.

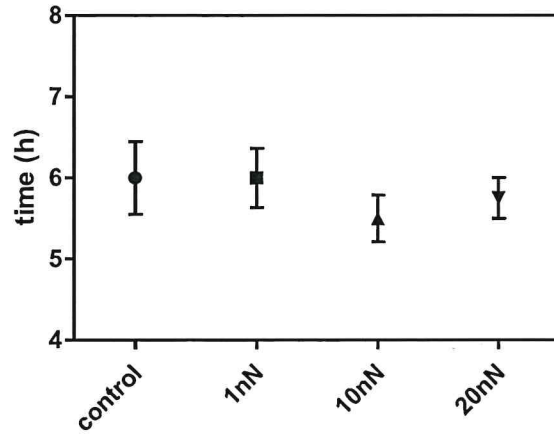


Figure 9. Tempo necessario a raggiungere la degradazione dopo il recupero in funzione della forza di indentazione. ($N=6$ per ogni condizione)

Una ulteriore analisi per valutare l'effetto della stimolazione meccanica sulla dinamica del processo di degradazione degli ovociti dopo il prelievo, è stata condotta monitorando l'esocitosi dei granuli corticali con una sonda fluorescente che si lega al mannosio da questi rilasciato. Due ore prima di qualsiasi cambiamento morfologico visivo correlato alla degradazione degli ovociti, abbiamo osservato che il segnale di fluorescenza correlato al CG aumenta sia in assenza che in presenza di forze applicate, con un graduale allargamento in funzione del tempo della risposta del GC quando per forze applicate pari a 20 nN. Questo dato conferma che forze applicate uguali o inferiori a 10nN non influenzano l'esocitosi CG e non inducono un invecchiamento prematuro degli ovociti in vitro. I dati sono riportati in Figura 8.

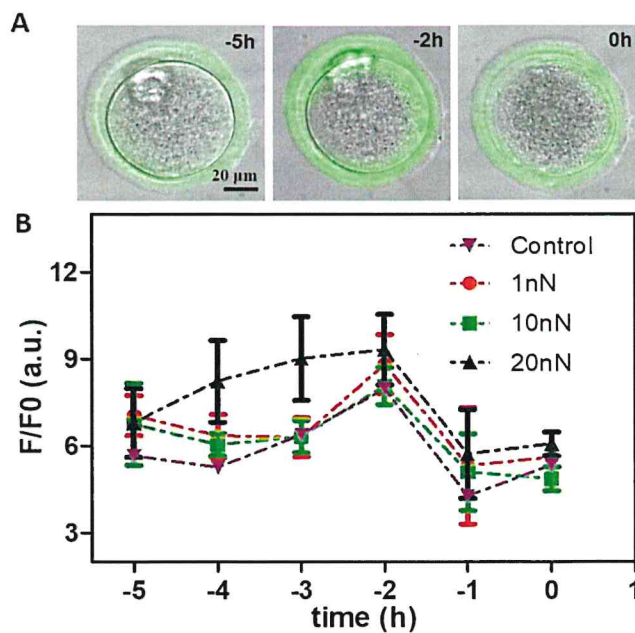


Figure 10. (A) Sovrapposizione delle immagini in campo chiaro e fluorescenza a diversi tempi di invecchiamento dell'ovocita, (B) esocitosi dei granuli corticali in funzione del tempo per stimolazioni

meccaniche di 1nN, 10nN e 20nN (in rosso, verde e nero) e in assenza di stimolazione (viola) (N=6, per ciascuna condizione).

Utilizzando le procedure sopra descritte è stata studiata l'evoluzione delle proprietà meccaniche degli ovociti a partire dal tempo di prelievo, ottimizzando le procedure di pulizia e rimozione delle cellule del cumulo mantenendo i tempi di preparazione al di sotto di un'ora dal momento del sacrificio dell'animale. Gli ovociti sono stati quindi studiati individualmente e misurati ogni ora, mantenendoli in incubatore in condizioni fisiologiche controllate tra due misure successive. In totale sono stati analizzati 35 ovociti provenienti da 6 differenti animali. Le misure sono state ripetute fino al sorgere dei primi segni visivi di degrado apoptotico. Nonostante le procedure di stimolazione ormonale, prelievo e misura siano state ottimizzate e riprodotte con variazioni inferiori alla mezz'ora, i tempi di naturali d'invecchiamento degli ovociti non sono altrettanto prevedibili. In particolare al momento del prelievo gli ovociti si trovano ad un tempo di invecchiamento non noto che può variare di alcune ore tra cellula e cellula. Gli ovociti sono stati quindi separati in due gruppi: il gruppo (A) che non raggiunge alla fine dell'esperimento uno stato di degradazione apprezzabile al microscopio e il gruppo (B) che invece dopo 6-8 h entra in uno stato pre-apoptotico. Le misure meccaniche del primo gruppo sono state ordinate temporalmente a partire dal tempo zero di prelievo (Figura 11A). Le misure del secondo gruppo sono state ordinate a ritroso a partire dal momento in cui la degradazione è evidente (Figura 11B). Nel primo caso i valori di E2 si mantengono inalterati per tutto il periodo di osservazione. Nel secondo caso due ore prima dell'ingresso nello stadio pre-apoptotico la cellula mostra un incremento significativo della rigidità della zona pellucida, nonostante all'esame visivo non si evidenzino differenze significative.

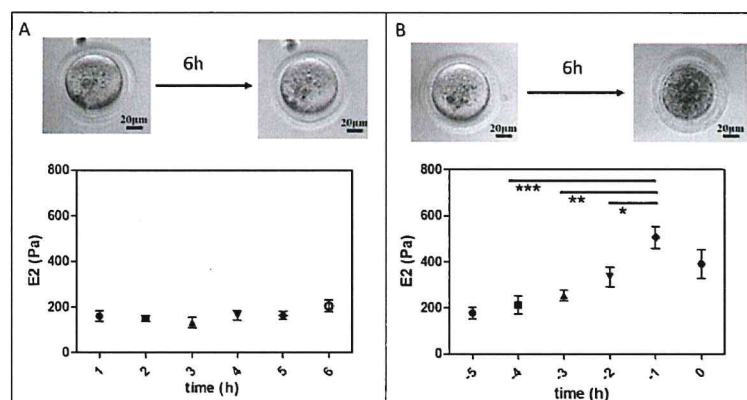
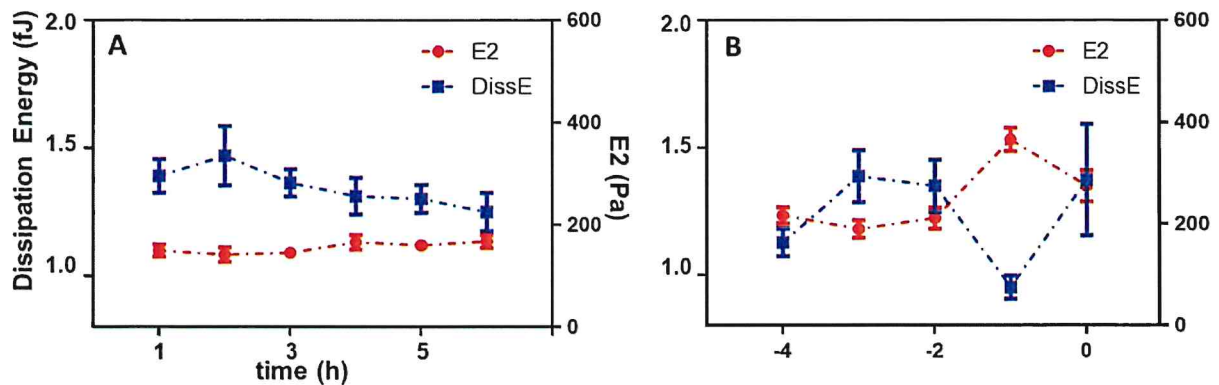


Figure 11. (A) Morfologia degli ovociti e variazione di E2 durante l'invecchiamento in vitro per gli ovociti che non hanno raggiunto la degradazione durante il periodo di osservazione (fino a 6 ore dal prelievo/scongelo). La variazione non è significativa ($p > 0,05$). La scala temporale è numerata in ore dal recupero (N=15). (B) Un ovocita sano è caratterizzato da un citoplasma chiaro moderatamente granulato e da un ooplasma di forma rotonda. Al contrario, le caratteristiche visive legate alla degradazione cellulare sono un citoplasma scuro e una membrana plasmatica indistinta. La variazione E2 viene mostrata durante l'invecchiamento in vitro per gli ovociti che hanno raggiunto la degradazione durante il periodo di osservazione (fino a 6 ore dal recupero/scongelo). I dati di ciascuna cellula sono allineati al tempo di degradazione e riportati indietro rispetto alla scala temporale del tempo prima del degrado. Si osserva un aumento significativo della rigidità ZP un'ora prima del degrado visivo (N=20). Il livello di significatività è stato fissato a * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$

Una ulteriore conferma di una modifica strutturale della zona pellucida è data dall'analisi dell'energia dissipata durante la misura di indentazione che vede un brusco calo un paio di ore prima della degradazione confermando

l'ipotesi una trasformazione molecolare (cross-linking) delle glicoproteine che di cui è costituita. La Figura 12



riporta i dati di rigidità e dissipazione allineati nel tempo a ritroso a partire dal momento della degradazione.

Figure 12. L'andamento di rigidità e viscosità durante l'invecchiamento in vitro: la rigidità (rappresentata dalla variazione di E2 in rosso) aumenta, l'energia viscosa di dissipazione (in blu nel grafico) diminuisce e viceversa. (N=20), (A) ovociti che non hanno raggiunto la degradazione durante il periodo di osservazione, (B) ovociti che hanno raggiunto la degradazione durante il periodo di osservazione

Uno possibile spiegazione per questo improvviso irrigidimento della ZP è un meccanismo evolutivo che impedisca la fertilizzazione di ovociti in una prima fase di degradazione, che darebbe ancora vita ad un embrione, ma con ridotte probabilità di portare a termine la gravidanza. Un fenomeno analogo, noto come *zona hardening* è stato postulato come meccanismo coinvolto nella prevenzione della polispermia e stimolato dall'esocitosi dei granuli corticali a seguito dell'ingresso di uno spermatozoo all'interno della cellula uovo. Per valutare se esiste una correlazione tra i due fenomeni sono stati condotti esperimenti in cui sono state misurate contemporaneamente le proprietà meccaniche degli ovociti e la fluorescenza legata all'esocitosi dei granuli corticali, in funzione del tempo, e allineati a ritroso a partire dal momento della degradazione. In figura 13 sono riportati i dati ottenuti dai quali si osserva una correlazione temporale tra i due fenomeni compatibile con un rapporto di causa effetto tra l'esocitosi dei granuli corticali e l'indurimento della zona.

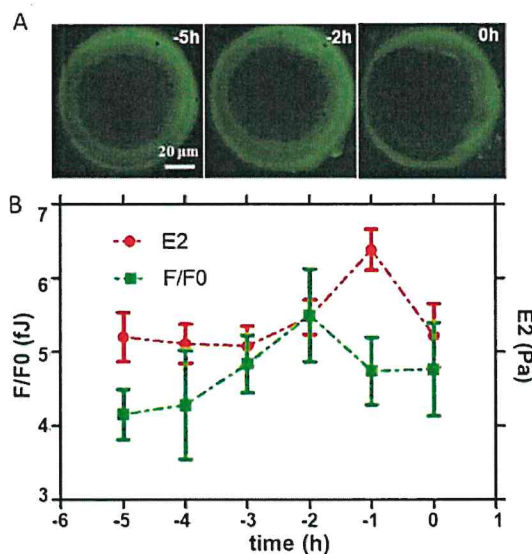


Figure 13. (A) variazione dell'intensità di fluorescenza correlata al CG mostrata in tre diversi momenti prima del verificarsi del degrado visibile; (B) Intensità di fluorescenza legata all'esocitosi dei granuli corticali (in verde) e il valore di E2 (in rosso) in funzione del tempo. I risultati mostrano un progressivo aumento della rigidità dell'ovocita invecchiato che è anticipato da un aumento della fluorescenza correlata al rilascio di CG.

Dai dati ottenuti è possibile concludere che la misura delle proprietà meccaniche degli ovociti, ottenuta tramite misure di indentazioni con microscopia AFM, rappresenta un indicatore importante per la valutazione dell'età post-prelievo degli ovociti e quindi un parametro importante da implementare per migliorare la resa dei processi di fertilizzazione in vitro, in particolare la ICSI.

È a questo punto importante stabilire se il comportamento evidenziato è osservabile solo grazie alla elevata sensibilità della microscopia a forza atomica, tecnica che tuttavia sarebbe di difficile implementazione in clinica, o assume un valore più generale e può essere ottenuta anche con apparati più semplici e maggiormente compatibili con la pratica clinica.

A questo scopo abbiamo effettuato misure di stress-rilassamento, una misura meccanica di maggiore diffusione, utilizzata in molti ambiti per la misura delle proprietà di svariate tipologie di materiali. Per fare le misure ci siamo avvalsi della metodologia descritta in precedenza, basata su speciali cantilever fabbricati presso CNR-IOM, e già applicata in via preliminare a ovociti umani. La figura 14 mostra una fase della misura di stress-rilassamento e una tipica curva di forza vs tempo ottenuta su un ovocita murino. Applicando il modello di Voigt, che descrive l'ovocita come un sistema di molle e dissipatori viscosi ideali, si ottiene un decadimento composto da tanti esponenziali quante sono le componenti in gioco con un tempo caratteristico $\tau = \eta/E$. Nelle nostre misure è stata imposta una deformazione di $20\mu\text{m}$, pari al 20% delle dimensioni dell'ovocita, che, al contrario di quanto illustrato in precedenza per le misure di indentazione coinvolge sia la zona pellucida che l'ooplasma.

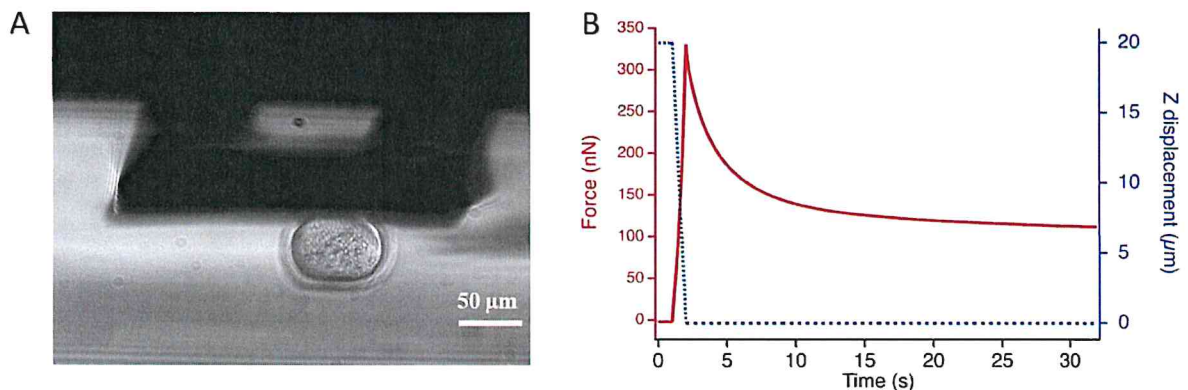


Figure 14. (A) vista laterale dell'ovocita compresso dalla macro-sonda, (B) misurazione del rilassamento da stress di un ovocita, in cui viene applicata una deformazione di $20\mu\text{m}$ per 30 secondi (lo spostamento è rappresentato in blu). Durante questo tempo si può misurare la forza esercitata dalla cella sulla sonda (in rosso)

Le misure effettuate su diversi ovociti in funzione del tempo sono illustrate in figura 15. Tre ore dopo il prelievo τ_1 evidenzia una diminuzione significativa, compatibile con l'aumento del modulo di Young e la diminuzione dei meccanismi viscosi già evidenziati con le misure di indentazione. Ulteriori misure di indentazione limitate alla sola zona pellucida o al solo ooplasma hanno permesso di attribuire univocamente τ_1 alla prima e τ_2 al secondo (che infatti non mostra nessuna modifica legata all'invecchiamento).

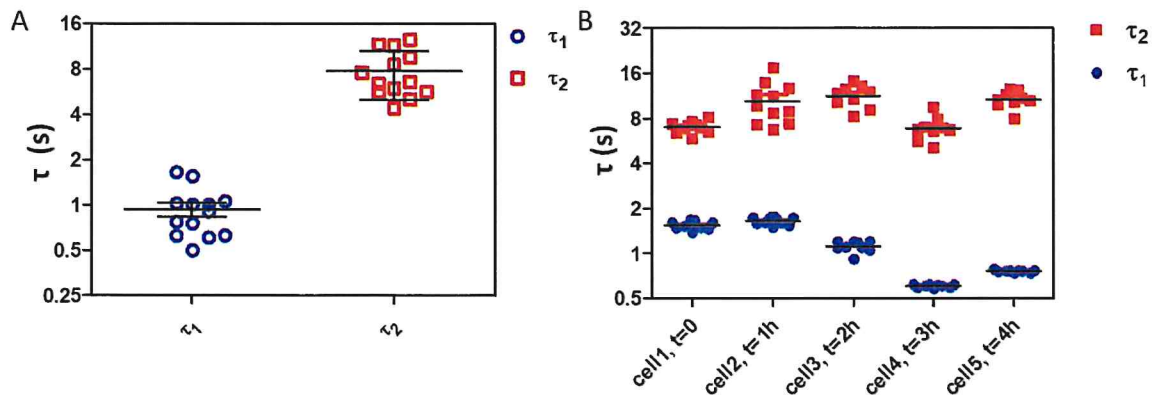


Figure 15. : (A) tempi di rilassamento (τ_1 e τ_2) mediato per 5 ovociti subito dopo il prelievo; (B) la variazione nel tempo durante l'invecchiamento post-ovulatorio degli ovociti di τ_1 e τ_2 per 5 cellule uovo. Ogni punto qui corrisponde ad una misura indipendente

In conclusione abbiamo dimostrato utilizzando un modello murino, che gli ovociti vanno incontro ad un processo di degradazione che diviene visibile all'ispezione visiva al microscopio circa 6-8 ore dopo il prelievo. Le modifiche ottiche sono precedute da un moderato rilascio dei granuli corticali e da un irrigidimento della zona pellucida. Tale irrigidimento può essere misurato tramite misure di indentazione, come ad esempio con un microscopio AFM o tramite misure di stress-rilassamento utilizzando un reometro, e non dipendono in maniera critica dalla tecnica adottata.

In tabella 1 viene riassunto il protocollo di misura ottenuto

parametro	indentazione	Stress-rilassamento
preparazione	denudamento	denudamento
substrato	Petri dish in Plastica	Petri dish in Plastica
Forza (nN)	1-10	100-300
deformazione	1% (1 μ m)	20% (20 μ m)
Tempo misura	10sec	100sec
# misure	> 10	> 5
Dimensione della sonda	> 5 μ m	> 100 μ m

IV. Validazione dei parametri meccanici ai fini del successo della fecondazione.

La misura delle proprietà meccaniche necessita la rimozione delle cellule del cumulo, altrimenti le proprietà meccaniche di queste ultime possono contribuire in maniera determinante al risultato finale, inficiandone la significatività.

D'altra parte le cellule del cumulo producono una serie di fattori che sono coadiuvanti per il processo di fecondazione. In assenza di cellule del cumulo, gli spermatozoi non possono penetrare l'ovocita, a meno di non ricorrere alla pratica ICSI.

Per ottenere una valutazione della resa del processo di fecondazione il più generale possibile, è stato scelto di applicare il protocollo FIVET, e condizionare il terreno di coltura in cui ovociti e spermatozoi sono tenuti, mantenendo in co-cultura anche le cellule del cumulo dopo la pulizia dell'ovocita (Figura 16)

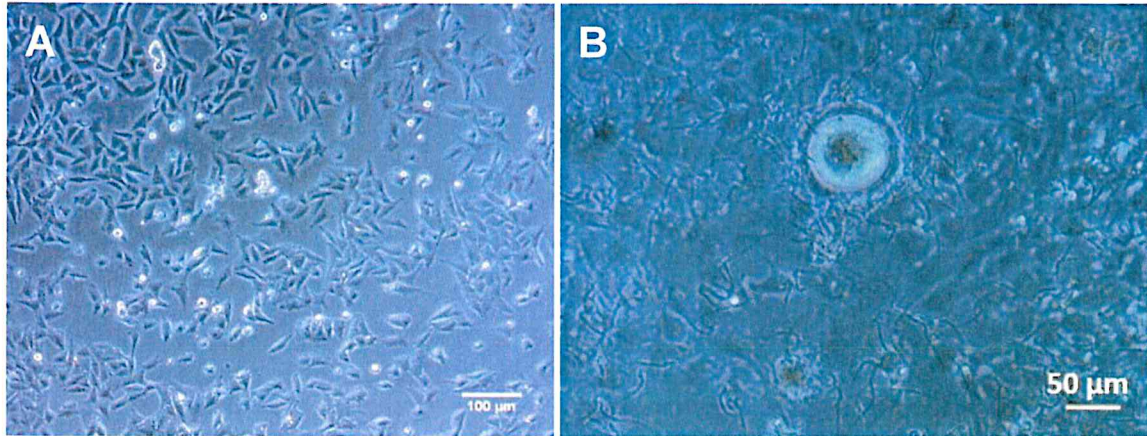


Figure 16: (A) immagine in contrasto di fase delle cellule del cumulo in coltura; (B) Un ovocita circondato da spermatozoi all'interno della goccia di medium usato per l'incubazione sopra un "letto" di cellule del cumulo.

In figura 17 mostriamo i primi risultati relativi alla formazione di embrioni a livello di due cellule e di blastocisti. In totale questi esperimenti hanno riguardato 6 ovociti appena estratti e 6 ovociti 6 ore dopo il prelievo.

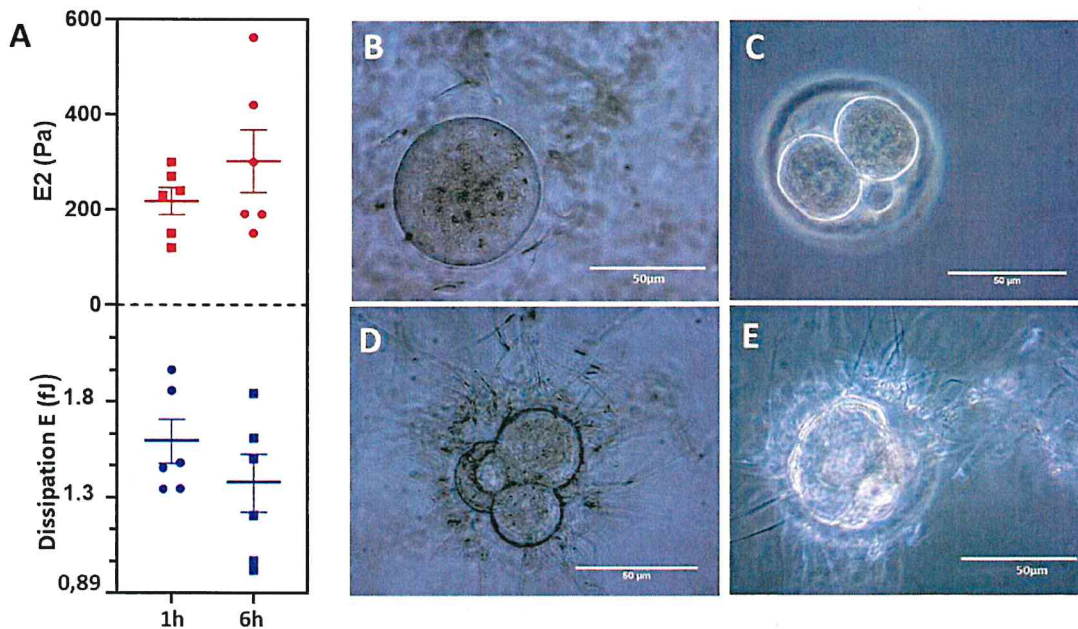


Figure 17. (A) La variazione dell'energia di dissipazione (in blu) e E2 (in rosso) per due gruppi di 6 ovociti 1 ora dopo lo scongelamento e 6 ore dopo. Tre di essi evidenziano un significativo cambiamento dei parametri meccanici nel campione invecchiato. (B) immagine ottica dell'ovocita nella goccia di fecondazione, (C) embrione a 2 cellule, (D) ovocita apoptotico frammentato, (E) blastocisti precoce

La tabella 2 mostra i risultati di successo di fertilizzazione FIVET per i 12 ovociti esaminati. Non è stato possibile monitorare la storia di ciascun ovocita singolarmente per cui i dati sono presentati in forma aggregata. Questo non consente di stabilire un relazione biunivoca tra la variazione dei parametri meccanici e il successo della fertilizzazione.

Time elapsed from thawing	N total	N 2-cell	N ooplasm fragmentation	N blastocyst	Stiffness (E)
3h	6	4	0	3	218+/-70
8h	6	1	2	0	306+/-160

I dati tuttavia danno una chiara indicazioni che:

“Le misure meccaniche degli ovociti realizzate con il metodo della indentazione con il protocollo descritto in questo report rappresentano un promettente indicatore della qualità dell’ovocita e del successo della procedura di fecondazione in vitro.”

V. Sviluppo delle metodologie per lo studio delle proprietà mecano biologiche di biopsie da tumori del tessuto mammario.

La caratterizzazione biomeccanica dei tumori solidi sta ricevendo una grande attenzione dal punto di vista diagnostico. Mentre le singole cellule metastatiche cambiano la struttura del citoscheletro per favorire la migrazione, diventando più soffici, nell’architettura del tessuto il cambiamento meccanico è più complesso, in quanto coinvolge anche gli elementi strutturali, più rigidi, della matrice extracellulare (ECM). La possibilità di studiare la struttura complessa, eterogenea, del profilo biomeccanico di fettine biotipiche di tumori solidi, correlandola ad analisi di immunoistochimica e possibilmente alla presenza di determinati biomarcatori/indicatori di progresso tumorale (nel caso di tumore al seno, ad esempio, lo stato del linfonodo sentinella) è dunque di grande valore per aumentare il valore prognostico e predittivo dell’indagine diagnostica. A tal fine, sono stati sviluppati i protocolli per l’analisi biomeccanica di tessuti biotipici provenienti sia da zone istologiche diverse di tumori di uno stesso paziente che da tumori di differenti pazienti.

Inizialmente, l’attenzione è stata posta sulle proprietà biomeccaniche di fettine provenienti da microcarotaggi di tumore al seno di tipo Luminal B (Figura 8), disposti in configurazione di tissue micro-array (TMA)



Figura 18. Immagine di carote di tessuto di neoplasie luminali B poste su vetrino. Ogni core, del diametro di 1 mm, è stato ottenuto da tessuto tumorale fissato in formalina ed incluso in paraffina. Da ogni neoplasia si sono ottenuti tre diversi core.

Per l'ottenimento dei TMA, a partire dal blocco bioptico del tumore sono state tagliate sezioni da 20 μm di spessore che sono state posizionate su vetrini caricati elettrostaticamente e sottoposte alla rimozione della paraffina e all'idratazione mediante passaggi in soluzioni di xilolo e etanolo a diluizione crescente.

Per l'analisi biomeccanica, si è ottimizzato un protocollo di misura AFM che utilizza microcantilever soffici (costante elastica 0.03 nN/m, frequenza di risonanza 10 kHz) alla cui terminazione è stata posizionata un sfera di silice del diametro di 20 μm . Mappe delle proprietà meccaniche di ogni sezione (curve di indentazione forza-distanza) sono state ottenute in buffer salino (PBS), utilizzando un campionamento di passo di circa 50 μm , con velocità di indentazione di 2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$, fino a una indentazione massima di 250 nm. Le curve così ottenute sono state analizzate utilizzando il modello di Hertz per l'indentazione e sono stati ricavati i parametri locali di rigidità.

Tuttavia, è stato riscontrato che i campioni mantenuti in soluzione per tempi superiori a qualche decina di minuti tendono a staccarsi dal substrato, rendendo complicata una analisi più accurata o un campionamento più denso.

Un esempio di mappatura biomeccanica relativa a tre diverse fettine di tessuto e comparata con le relative immagini ottiche, è riportato in figura 9. L'immagine ottica viene divisa in una grid di 50 μm x 50 μm usando il software Image J. La curva di indentazione viene registrata in corrispondenza del centro di ciascun quadratino. I valori di modulo elastico ottenuti interpolando le curve forza-indentazione con un modello Hertziano utilizzando il pacchetto software Nova-Px 3.4 vengono riportati nella mappa della colonna di destra della Figura 9.

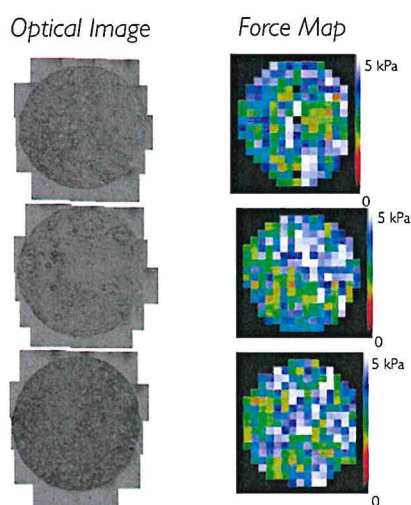


Figura 19. Immagine ottica e di modulo elastico (AFM) di 3 carote di tessuto di neoplasie luminali B poste su vetrino, come da Figura 8.

A questo livello, abbiamo osservato una distribuzione di valori relativi di *stiffness* in un range compreso tra 1kPa e 5 kPa, più uniforme in corrispondenza della terza fettina (più in basso), anche in accordo alla immagine di distribuzione di densità ottica. Questi valori non sono stati ancora confrontati con quelli un tessuto sano, ma hanno un valore funzionale in termini differenziali. Data la disomogeneità del tessuto è infatti difficile stabilire come procedere con una normalizzazione efficace. Peraltro, il range di valori di modulo elastico misurato è in linea con i dati riportati in letteratura.

Sono al momento in fase di analisi le proprietà meccaniche degli stessi campioni utilizzando una sonda nanometrica al posto della sfera micrometrica, per mettere in evidenza caratteristiche di rigidità cellulare rispetto a rigidità stromale e per meglio differenziare lesioni benigne da lesioni cancerose.

VI. Analisi delle banche dati tissutali e costruzione di una mappa di correlazione tra le proprietà mecano biologiche e decorso della malattia.

A questo scopo, sono stati utilizzati tissue-microarray (TMA) ottenuti da 100 pazienti affette da carcinoma mammario sottoposte ad intervento chirurgico presso la Clinica Chirurgica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Udine.

Pazienti incluse nello studio

Le pazienti presentavano una neoplasia insorta *de novo*, non erano state sottoposte a trattamento neoadiuvante e non presentavano metastasi a distanza. Tutti i campioni sono stati rivalutati da un anatomo-patologo esperto (Prof.ssa Di Loreto), e per ciascun campione è stato definito: istotipo, (secondo la classificazione WHO dei tumori della mammella aggiornata al 2012), grado tumorale (secondo il *grading* istologico modificato di *Elston – Ellis* 2002), sottotipo tumorale molecolare (*Schmitt* 2010) e stadio patologico secondo il TNM. La definizione di quest'ultimo si è basata sulla determinazione mediante immunohistochimica della percentuale di espressione del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PR), di Ki67 e di HER2. La valutazione dello stato di amplificazione di HER2 è stato confermato mediante FISH (*fluorescence in situ hybridization*). L'espressione dei marcatori Ki-67 (1:200, clone Mib-1, Dako), ER (1:200, Clone SP1, procured from Neomarkers), PR (1:100, clone PgR 636, Dako) and HER2 (HercepTest, Dako) è stata rilevata mediante immunohistochimica su sezioni da 4µm di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, utilizzando il sistema di rivelazione Dako EnVision System (Dako), mediante coloratore automatico DakoAutostainer. La tecnica FISH per HER2 è stata eseguita su sezioni di 4µm di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, utilizzando il dual-probe PathVysion kit (Vysis, Abbott), seguendo le istruzioni del produttore. La positività per ER o PR è stata definita utilizzando come *cut-off* 1%.

Sono quindi stati selezionati:

25 carcinomi consecutivi di tipo *Luminal A* (positività per ER o PR, Ki67<15%, HER2 non amplificato/overespresso);

25 carcinomi consecutivi di tipo *Luminal B* (positività per ER o PR, Ki67≥15%). Dei 25 campioni, due presentavano amplificazione del gene HER2;

25 campioni consecutivi di tipo HER2 (ER-, PR-, HER2 amplificato/overespresso);

25 campioni consecutivi di tipo *Triple Negative* (ER-, PR-, HER2 non amplificato o overespresso).

La diversa frequenza dei diversi tipi molecolari nella popolazione generale ha fatto sì che mentre tutti i *Luminal A* e *Luminal B* derivavano da neoplasie rimosse chirurgicamente nel 2015, gli HER2 e i *Triple Negative* derivavano da neoplasie rimosse chirurgicamente negli intervalli 2011-2015 e 2013-2015, rispettivamente.

Allestimento dei TMA

Dai campioni di carcinoma mammario, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono state sezionate al microtomo sezioni dello spessore di 4 µm. Sulle sezioni in Ematossilina-Eosina un anatomo-patologo esperto (Prof.ssa Di Loreto) ha evidenziato la zona d'interesse. Dopo aver riportato la zona segnalata dal vetrino al corrispondente blocchetto, si è potuto procedere con il processo di "carotaggio", processo che ha permesso il recupero dell'area di interesse precedentemente evidenziata nel corrispettivo vetrino colorato con Ematossilina-Eosina. Con un sistema di "carotaggio" tramite un apposito ago cavo, 3 piccole biopsie (core) del diametro di 1 mm sono state prelevate da ciascun blocco di tessuto in paraffina (blocchetti donatori) e poi allineate, secondo una struttura matriciale, in un nuovo blocchetto di paraffina vuoto (blocchetto ricevente) (Figura 10). Nel nostro studio è stato utilizzato il sistema Galileo TMA CK4500 (Integrated Systems Engineering).

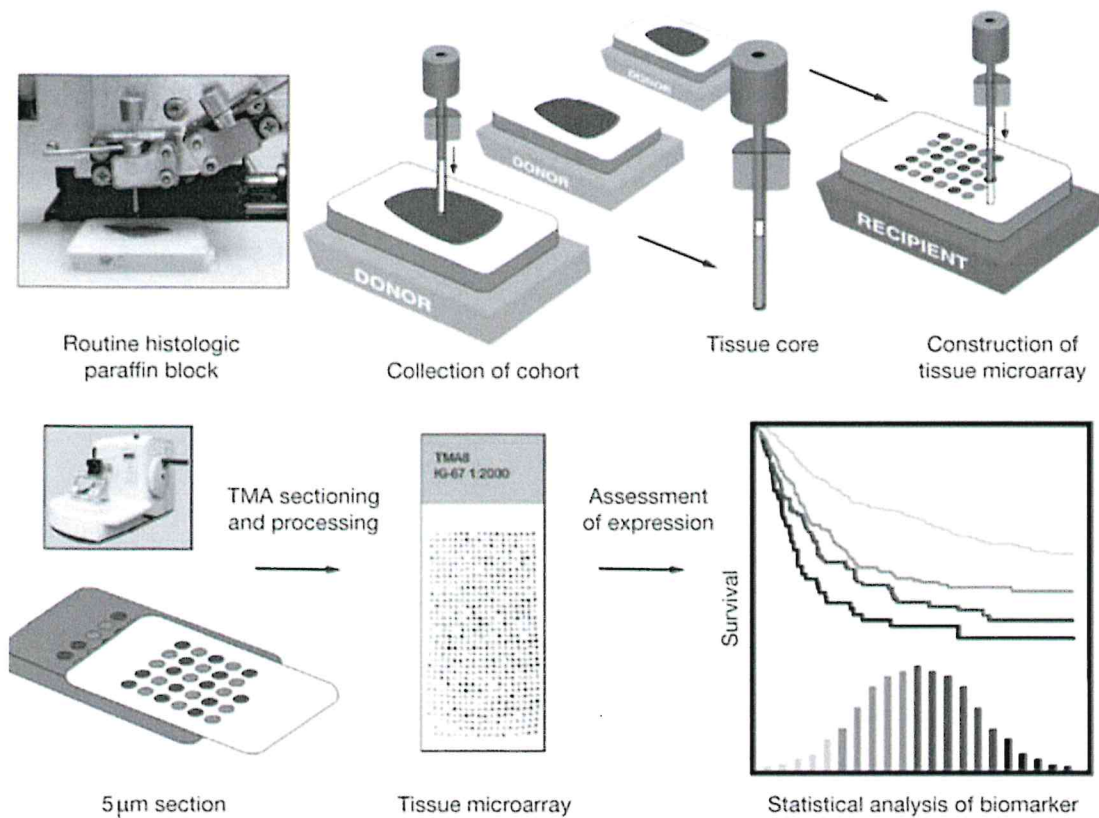


Figura 20. Costruzione di un TMA per la valutazione di biomarcatori. Tratto da: *Nat Clin Pract Oncol* 1: 104–111 doi:10.1038/ncponc0046

Per orientare il blocchetto si sono utilizzati dei carotaggi di tessuto differente fra loro e da quelli in esame. I carotaggi di orientamento utilizzati in questo lavoro sono stati ottenuti da tessuto murino (Figura 11).

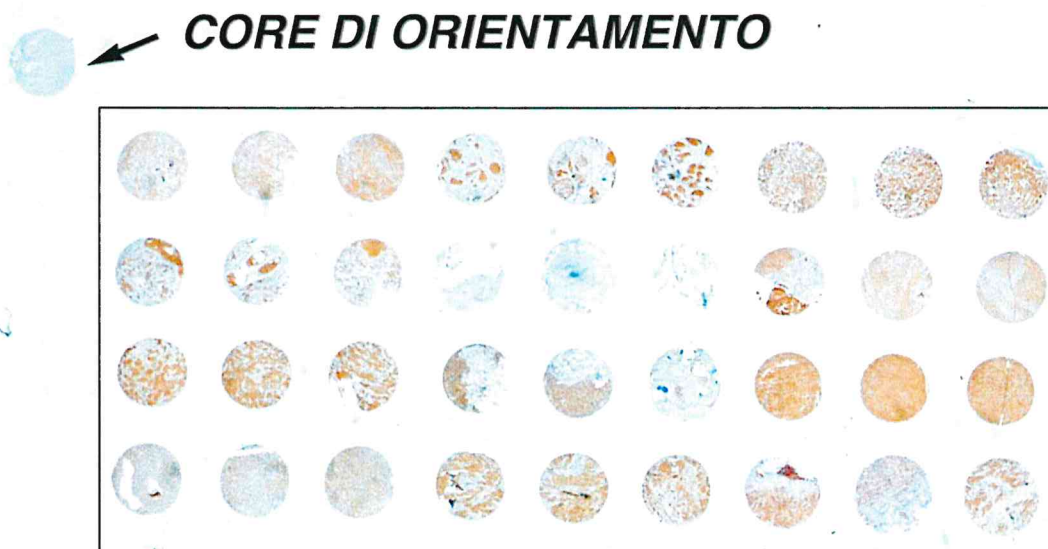


Figura 21. Esempio di TMA colorato in immunocistochimica. In alto a sinistra si apprezza il core costituito dal tessuto murino utile all'orientamento. Per ciascun tumore mammario sono stati inseriti 3 core, come facilmente evidenziabile in questo preparato. Immagine macroscopica acquisita mediante Leica DMD108 (Leica).

I campioni, divisi per tipo molecolare, sono stati inseriti all'interno del blocchetto ricevente in ordine cronologico di accettazione del campione da parte dell'Istituto di Anatomia Patologica, ottenendo così 8 blocchetti di TMA (2 per ciascun tipo molecolare).

Per la rilevazione dei dati clinici e patologici (età della paziente alla diagnosi, istotipo, grado, presenza d'invasione vascolare, stadio TNM, ER, PR, HER, Ki67) sono state create delle tabelle excell da implementare successivamente con i dati biomeccanici.

2) Ulteriori Risultati.

Ulteriori esperimenti sono stati svolti durante lo svolgimento del progetto con il coinvolgimento dei partner di progetto, indirizzati a identificare altri campi di applicazione degli studi biomeccanici in ambito medico e ospedaliero.

La collaborazione tra **CNR-IOM** e **ospedale universitario di Udine** ha consentito di studiare e verificare che i periciti (Pc) che risiedono nei cuori umani con insufficienza ischemica mostrano alterazione delle proprietà di mecano-trasduzione e valutare quali alterazioni nei meccanismi di mecano-trasduzione sono associate con la risposta alterata osservata agli stimoli meccanici. Questo studio è importante perché i Pc sono coinvolti nei processi di angiogenesi, che a loro volta sono essenziali nel processo di riparazione del tessuto cardiaco ischemico.

Lo scompenso cardiaco rappresenta, infatti, la prima causa di morte nel mondo occidentale. Diversi studi hanno analizzato il ruolo degli stimoli meccanici nel controllo della morfogenesi del sistema cardiovascolare, oltre ad un ruolo emergente come determinanti nella patologia cardiaca. Recentemente, è stato evidenziato come la microcircolazione coronarica abbia un marcato impatto sui sintomi e sulla prognosi dello scompenso cardiaco nei pazienti affetti da ischemia, anche in presenza di aterosclerosi. I periciti sono una popolazione cellulare eterogenea residente a livello della lamina basale dei vasi del microcircolo, in stretto contatto con le cellule endoteliali, la quale esercita funzioni regolatorie fondamentali nella microcircolazione.

Pertanto, nell'ambito del presente progetto, si è voluto verificare se i periciti residenti nel cuore infartuato presentano proprietà meccaniche alterate e quali alterazioni nei meccanismi della mecano-trasduzione sono associate con i difetti osservati nella risposta agli stimoli meccanici. Abbiamo osservato come nei cuori infartuati sia presente una rarefazione dei vasi del microcircolo e come l'attivazione della pathway di YAP/TAZ sia alterata. In particolare, nonostante sia i periciti derivati da donatori sani sia quelli derivati da cuori espuntati supportano l'angiogenesi, questi ultimi *performano* peggio dei primi. Infatti, i periciti da cuori scompensati presentano ridotta densità delle adesioni focali, ridotta attivazione della pathway di FAK/CAS, ridotta espressione di caveolina-1 e alterata trasduzione del segnale della stiffness extracellulare a livello intracellulare. Inoltre, abbiamo potuto verificare come l'inibizione di MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) sia in grado di ripristinare la traslocazione nucleare di YAP/TAZ. In conclusione, abbiamo dimostrato che lo scompenso cardiaco induce un'alterazione dei meccanismi di mecano-trasduzione dei periciti, ma questo difetto può essere revertito farmacologicamente.

La collaborazione tra **CNR-IOM** e **IRCCS Burlo Garofolo**, nell'ambito dello studio dei processi di fertilizzazione ha consentito di rivolgere la nostra attenzione non solo agli ovociti ma anche agli spermatozoi, che sono stati studiati tramite una tecnica di microscopia a scansione di sonda, lo SNOM, o scanning optical microscope, che consente di ottenere immagini topografiche e ottiche con risoluzione inferiore al limite di diffrazione della luce, e quindi dei migliori microscopi ottici, normalmente utilizzati per valutare la qualità degli spermatozoi. Lo SNOM consente la combinazione in un'unica acquisizione della caratterizzazione della superficie e dell'organizzazione cellulare interna fornendo un'analisi immediata e completa del campione. Nel nostro lavoro immagini super-risolte di spermatozoi immobilizzati su vetrini sono state ottenute operando in modalità aperture-SNOM in aria. Nelle immagini SNOM sono state evidenziate con precisione submicrometrica tutte le strutture che normalmente vengono caratterizzate in microscopia elettronica a trasmissione. La tecnica consente di distinguere molto accuratamente le caratteristiche peculiari che contraddistinguono gli spermatozoi anomali da quelli sani. Il nostro lavoro ha evidenziato le potenzialità della tecnica SNOM proponendo la sua applicazione all'analisi ad alta risoluzione delle alterazioni morfologiche dello sperma, che potrebbero rivelarsi di grande utilità nell'ambito della medicina riproduttiva. In Figura S1 un confronto tra le informazioni ottenibili tramite microscopia ottica tradizionale e microscopia SNOM

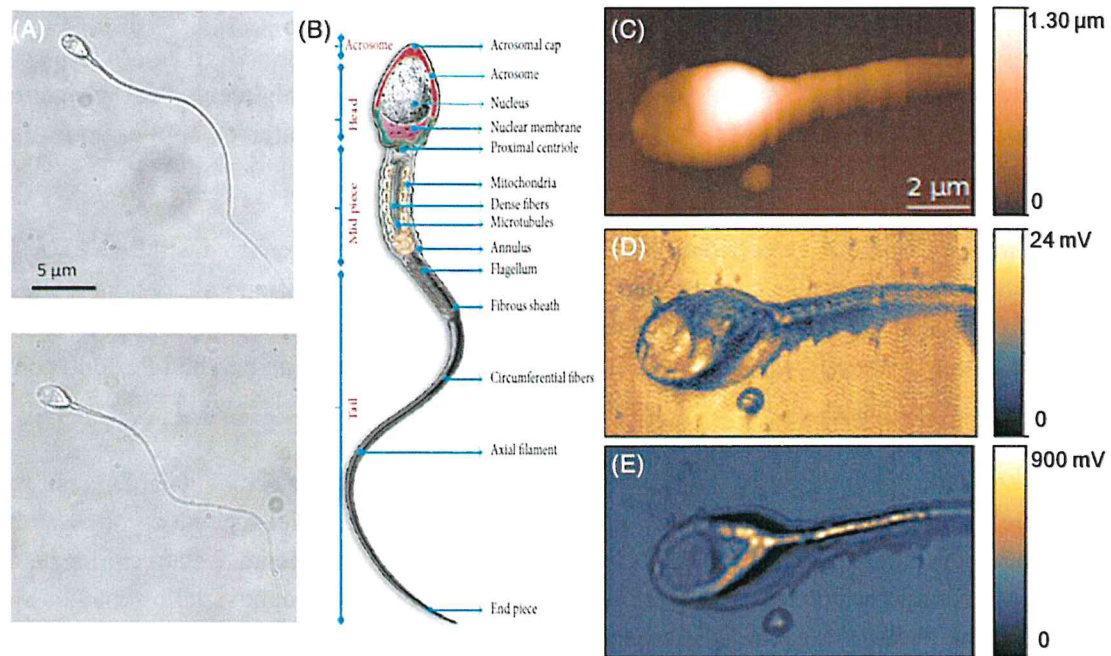


Figura S1. Spermatozoi umani con caratteristiche normali. (A) Immagine ottica in campo chiaro di spermatozoi con caratteristiche normali osservate con un obiettivo $\times 100$ (Zeiss); (B) principali strutture cellulari spermatiche; (C) Immagine SNOM in Topografia; (D) Immagine SNOM in riflessione; (E) Immagine SNOM in trasmissione

In collaborazione tra **CNR-IOM, Elettra Sincrotrone e ospedale universitario di Udine**, infine, è stato studiato un sistema basato sull'analisi delle proprietà meccaniche cellulari per valutare la tipologia e quindi l'aggressività di cellule di glioma/glioblastoma umano.

Il glioma è uno dei tumori cerebrali più comuni le cui caratteristiche peculiari sono rappresentate dalla migrazione e invasione attiva delle cellule, che rendono questo tumore in grado di infiltrare rapidamente il tessuto cerebrale circostante, rendono impossibile la radicalità chirurgica e predisponendo allo sviluppo di recidive e all'insorgenza di resistenza alle terapie. Il glioblastoma, la forma più aggressiva di glioma, ha, infatti, una sopravvivenza mediana di soli 14 mesi.

Le cellule tumorali più importanti in questo processo sono le cellule staminali che iniziano i gliomi (GSC) e le cellule staminali del microambiente tumorale, dette cellule staminali associate ai gliomi (GASC) che, pur non essendo tumorigeniche, supportano attivamente la crescita del tumore. Per ottenere una comprensione più profonda del ruolo delle cellule staminali associate al glioma nella progressione tumorale, abbiamo studiato l'interazione tra GSC e GASC e la deformabilità cellulare mediante misurazioni di adesione e nano-indentazione mediante microscopia a forza atomica (AFM).

Precedenti risultati hanno mostrato che, sia nel glioma alto grado che in quello basso grado le cellule staminali che iniziano il cancro sono meno rigide di quelle associate al glioma non tumorigenico, in accordo con le loro caratteristiche neoplastiche [3]. Questa differenza di rigidità cellulare è stata individuata come potenziale parametro per la loro rilevazione all'interno del tessuto tumorale, rappresentando così un parametro diagnostico o prognostico. Tenendo conto di tale osservazione, abbiamo esplorato la possibilità di identificare cellule staminali inizianti glioma (GSC) sulla base delle loro proprietà meccaniche all'interno di una miscela cellulare derivante da espunti di pazienti con glioblastomi. Pertanto, abbiamo misurato la rigidità cellulare di una miscela cellulare derivante da espunti di pazienti mediante misurazioni di indentazione con AFM. Per distinguere le cellule staminali, le misurazioni dell'indentazione sono accoppiate con un test fluorescente basato sulla rilevazione dell'attività dell'aldeide deidrogenasi (ALDH), che ha dimostrato di avere successo nell'isolamento delle cellule staminali all'interno di diversi tumori. Analisi simili sono state condotte su culture di cellule note: colture di astrociti, cellule gliali non tumorali, e U87, una linea cellulare tumorale immortalizzata umana. La rigidità di queste cellule è stata confrontata l'intensità della fluorescenza. Detto confronto ha mostrato che nelle cellule di glioma derivate da espunti di glioma ad alto grado può essere rilevata

una percentuale di cellule non rigide altamente fluorescenti, identificate come cellule staminali che iniziano il cancro.

Tali risultati suggeriscono che l'analisi della rigidità cellulare può essere sfruttata per rilevare le cellule staminali che iniziano il cancro all'interno di una popolazione di cellule miste di glioma. Questo potrebbe rappresentare un nuovo approccio per identificare e isolare le cellule staminali tumorigeniche nel tessuto tumorale.

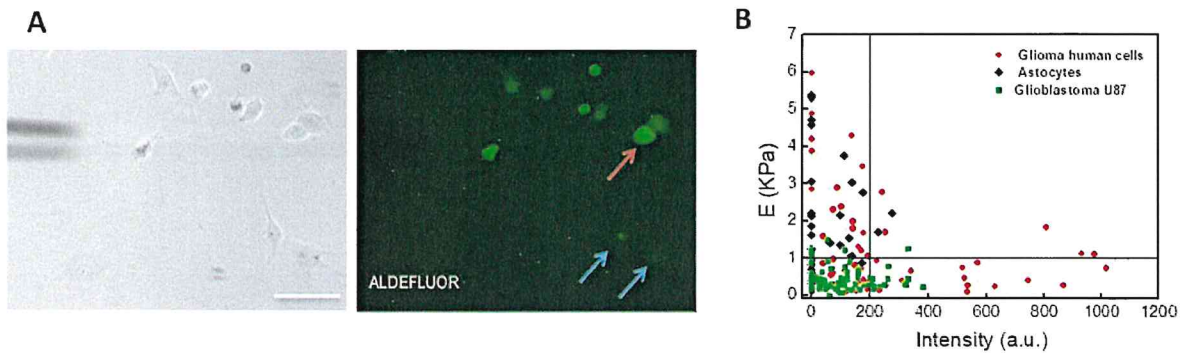


Figura S2: (A) Immagini in campo chiaro e ad epifluorescenza di cellule di glioma derivate da espianti umani; (B) Rigidità cellulare tracciata rispetto all'intensità di fluorescenza di cellule non tumorigeniche, (nero), linea cellulare di glioma (verde) e popolazione mista umana proveniente da paziente (rosso).

Uno dei meccanismi con cui GSC e GASC si influenzano è attraverso il rilascio di esosomi. Gli esosomi sono delle vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule e del diametro di 100-150 nm caratterizzate da un contenuto biologico costituito da proteine, acidi nucleici lipidi. Grazie al loro contenuto molecolare gli esosomi sono in grado di modificare le proprietà biologiche delle cellule target.

Abbiamo precedentemente dimostrato che gli esosomi rilasciati dalle GASC sono in grado di aumentare, in vitro, l'aggressività delle linee cellulari sia di GSC che di glioblastoma. Per capire quali molecole sono responsabili di questa funzione di supporto del tumore, abbiamo eseguito un'analisi proteomica descrittiva degli esosomi delle GASC e identificato, tra le altre proteine, la semaforina 7A (SEMA7A). SEMA7A è stata descritta come un segnale promigratorio in condizioni fisiologiche e patologiche e abbiamo ipotizzato che potesse modulare le proprietà migratorie del GSC. Qui, abbiamo dimostrato come che SEMA7A sia esposta sulla superficie degli esosomi delle GASC e segnala alle GSC attraverso l'integrina $\beta 1$. Nel nostro modello in vitro basato su cellule staminali di glioma ottenute da paziente, questa interazione attiva la chinasi di adesione focale nelle GSC e ne aumenta la motilità. I nostri risultati suggeriscono l'interazione integrina SEMA7A- $\beta 1$ come un nuovo target per interrompere la comunicazione tra le GSC e il microambiente di supporto.

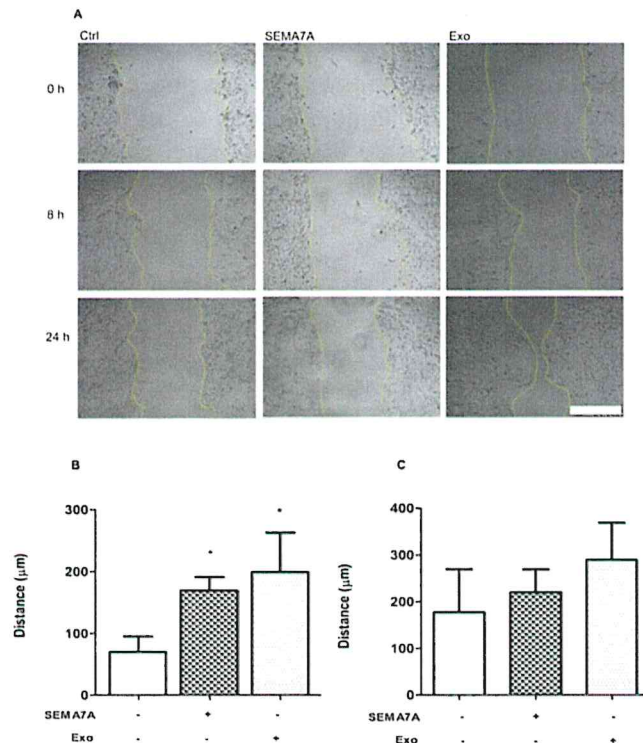


Figura S3: Gli esosomi derivati dalle cellule staminali associate a glioma (GASC) e SEMA-7A (Semaphorin7A) stimolano la motilità delle popolazioni di cellule staminali di glioma (GSC). (A) Immagini rappresentative di scratch assay di colture GSC non trattate (Ctrl), esposte a SEMA-7A-Fc 100 ng/mL (SEMA7A) o esosomi derivati da GASC (Exo) per 8 e 24 h. (B,C) La distanza coperta dalle cellule trattate come descritto in (A) e dalle cellule non trattate (Ctrl) dopo 8 (B) e 24 ore (C) è stata calcolata misurando l'ampiezza dello spazio tra i due margini del solco ottenuto nel monostrato mediante "scratch". Scala della barra = 200 μm. I dati sono presentati come media ± deviazione standard di 4 repliche (* $p < 0,01$ vs. Ctrl).

Elettra Sincrotrone in collaborazione con l'ospedale universitario di Udine ha anche approfondito i meccanismi mediante i quali gli esosomi interagiscono con le cellule bersaglio. Infatti, l'utilizzo di farmaci, che interagiscono con l'uptake degli esosomi da parte delle cellule bersaglio potrebbe rappresentare un potenziale nuovo approccio terapeutico per interrompere la comunicazione tra le cellule tumorali e il loro microambiente. A questo scopo, abbiamo testato composti che interferiscono con l'endocitosi, la macropinocitosi e la fagocitosi mediata dalla clatrina e dai rafts lipidici. Sono stati individuati tre farmaci (cloroquina, clorpromazina e filipina) in grado di inibire significativamente l'uptake degli esosomi e questo fenomeno è correlato con una significativa riduzione della motilità delle cellule di glioblastoma U87.

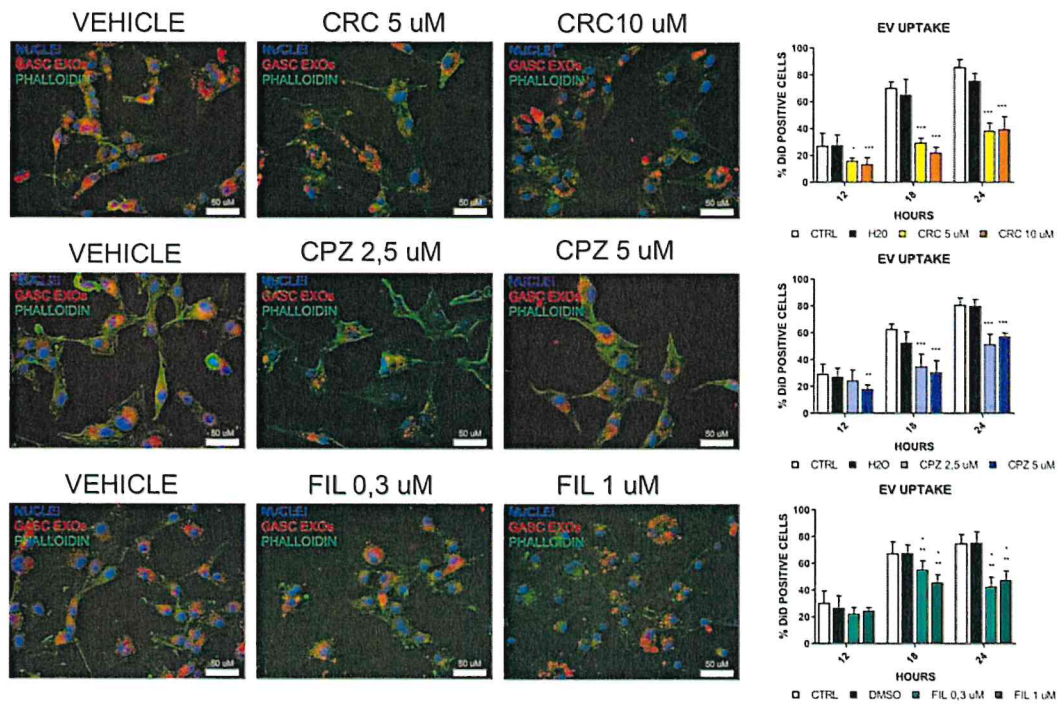


Figura S4: Le immagini fluorescenti dimostrano l'uptake, da parte delle cellule (marcate in verde dalla fluorescenza della falloidina e dal blu dei nuclei) degli esosomi prodotti dalla GASC (evidenziati dalla fluorescenza rossa) da parte delle cellule di glioblastoma U87 non trattate farmacologicamente (vehicle) o trattate con due dosi diverse di clorochina (CRC), clorpromazina (CPZ) e filipina (FIL). Scala della barra = 50 μ m. Gli istogrammi sulla destra mostrano come la percentuale di cellule che internalizzano gli esosomi si riduce significativamente a seguito del trattamento con i farmaci. I dati sono presentati come media \pm deviazione standard di 4 repliche.

Infine, abbiamo analizzato la capacità degli esosomi isolati dal surnatante di linee staminali rappresentative del microambiente tumorale (GASC) di modificare le proprietà meccaniche di linee commerciali di glioblastoma (U87) e di linee di cellule staminali di glioma isolate dai pazienti GSC. Si è visto che gli esosomi delle GASC riducono la *stiffness* di U87 e GSC. I dati sono stati ottenuti da Elettra Sincrotrone sulle cellule isolate e trattate presso il nostro laboratorio. Visti i risultati ottenuti, abbiamo ripetuto gli esperimenti su condizionando 3 linee GSC con gli esosomi prodotti dalle rispettive linee del microambiente. Sono quindi stati estratti i mirna delle linee trattate o meno con gli esosomi e si è proceduto al sequenziamento mediante RNA-seq. I dati sono ancora in fase di elaborazione da parte del gruppo bioinformatico dell'Università di Udine allo scopo di stabilire quali miRNA siano eventualmente responsabili dell'effetto degli esosomi sulle proprietà meccaniche delle cellule e attraverso quale pathway.

Le esperienze acquisite nel campo della biomeccanica tissutale sono state inoltre esplorate da **Elettra Sincrotrone** anche in collaborazione con l'Università di Trieste e il CRO di Aviano per lo studio del carcinoma ovarico sieroso ad alto grado (HGSOC) uno dei tumori ovarici a più alto livello di malignità e che presenta un alto livello di eterogeneità morfologica. Anche in questo caso la prognosi si basa prevalentemente su analisi morfologiche, data l'assenza di target molecolari efficaci. Negli ultimi anni si sono classificati diversi pattern di architettura tissutale, in particolare i HGSOC a pattern solido, endometrioido o intermedio, meno aggressivi dei classici papillare e micropapillare. Mancano però ad oggi valutazioni quantitative che mettano in relazione tali architetture a, per esempio, la resistenza a chemioterapie classiche basate su platino. L'idea quindi è stata quella di quantificare il tessuto dal punto di vista biomeccanico con AFM. Sono state acquisite mappe di biomeccanica di sezioni di tessuto di pazienti trattate con ematossilina e eosina (H&E) mettendo in evidenza diverse architetture tissutali. Queste mappe quantitative hanno permesso di discriminare la presenza e lo stadio di sviluppo del tumore nei diversi pazienti con HGSOC. In particolare pattern di tipo morfologico micropapillare, associato ad un alto grado di malignità, mostrano un valore più basso di rigidità rispetto alle

altre. Analogamente, stadio IV e III del tumore sono distinguibili dal punto di vista biomeccanico, provando l'utilità della tecnica per supportare in modo quantitativo analisi morfologiche classiche.

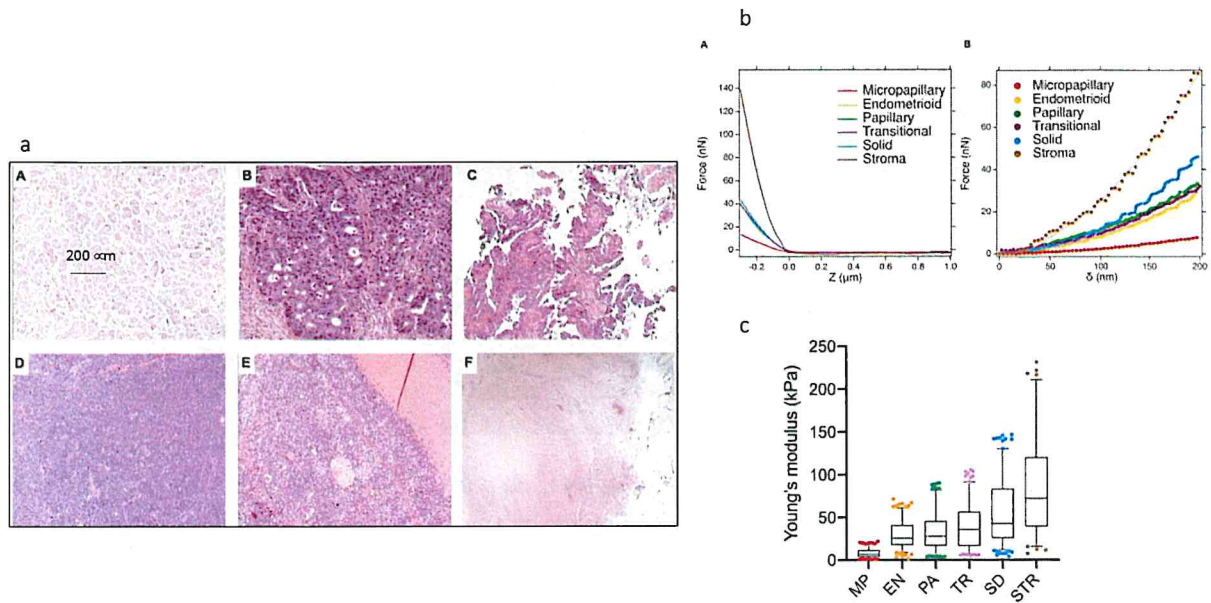


Figure S5: a) Immagini morfologiche di pattern di HGSOC (A-E) e di tessuto peritoneale sano (F). Micropapillare (A); Endometrioid (B); Papillare (C); Solido (D); 395 Intermedio (E); b) curve AFM forza-distanza (A) e forza-indentazione (B) rappresentative dei diversi pattern di HGSOC e di stroma (controllo); c) Boxplots del modulo di Young misurato con AFM per i diversi pattern di HGSOC e di stroma (controllo). MP = micropapillare; EN = endometrioid; PA = papillare; TR =intermedio; SD = solido; STR = stroma

Attività di disseminazione

1. Pubblicazioni realizzate con il contributo del progetto. (IOM; Elettra; Udine; Burlo)

Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from In Vitro Models.

Manini I, Caponnetto F, Bartolini A, Ius T., Mariuzzi L., Di Loreto C., Beltrami A.P. and Cesselli D.
Int J Mol Sci. **2018**,19(1):147. Published 2018 Jan 4. doi:10.3390/ijms19010147

Planar AFM macro-probes to study the biomechanical properties of large cells and 3D cell spheroids

Andolfi, L., Greco, S.L.M., Tierno, D., Chignola R., Martinelli M., Giolo E., Luppi S., Delfino I., Zanetti M., Battistella A., Baldini G., Ricci, G., Lazzarino, M.
Acta Biomaterialia, **2019**, 94, pp. 505–513

Study of the mechanical properties of fresh and cryopreserved individual human oocytes

Giolo, E., Martinelli, M., Luppi, S., Romano F, Ricci G., Lazzarino, M., Andolfi, L.
European Biophysics Journal, **2019**, 48(6), pp. 585–592

Semaphorin-7A on Exosomes: A Promigratory Signal in the Glioma Microenvironment.

Manini, I., Ruaro, M.E., Sgarra, R., Bartolini, A., Caponnetto, F., Ius, T., Skrap, M., Di Loreto, C., Beltrami, A.P., Manfioletti, G. and Cesselli D.
Cancers (Basel) **2019**, 11, doi:10.3390/cancers11060758.

Application of an Artificial Intelligence Algorithm to Prognostically Stratify Grade II Gliomas.

Cesselli, D., Ius, T., Isola, M., Del Ben, F., Da Col, G., Bulfoni, M., Turetta, M., Pegolo, E., Marzinotto, S., Scott, C.A., Mariuzzi L., Di Loreto C., Beltrami A.P., and Skrap M.
Cancers (Basel) **2019**, 12, doi:10.3390/cancers12010050.

Ultra-structural analysis of human spermatozoa by aperture scanning near-field optical microscopy

Troian, B., Boscolo, R., Ricci, G., Lazzarino M., Zito G., Prato, S., Andolfi, L.
Journal of Biophotonics, **2020**, 13(5), e2418

Scanning probe microscopies: Imaging and biomechanics in reproductive medicine research

Andolfi, L., Battistella, A., Zanetti M., Lazzarino M., Pascolo L., Romano, F., Ricci, G.
International Journal of Molecular Sciences, **2021**, 22(8), 3823

Heart failure impairs the mechanotransduction properties of human cardiac pericytes

Rolle, I.G., Crivellari, I., Zanello, A., Mazzega E., Dalla E., Bulfoni M., Avolio E., Battistella A., Lazzarino M., Cellot A., Cervellin C., Sponga S., Livi U., Finato N., Sinagra G., Aleksova A., Cesselli, D., Beltrami, A.P.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, **2021**, 151, pp. 15–30

Cell-stiffness and morphological architectural patterns in clinical samples of high grade serous ovarian cancers.

Azzalini, E, Abdurakhmanova, N, Parisse, P, Bartoletti, M, Canzonieri, V, Stanta, G, Casalis, L, Bonin, S.
Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine,
Accepted for publication **2021**

Microfabricated cantilevers for parallelized cell-cell adhesion measurements

Zanetti M., Chen S.N., Conti M., Taylor M.R.G., Sbaizero O., Mestroni L. and Lazzarino M.
Accepted for publication in *European Biophysical Journal* **2021**

Atomic Force spectroscopy-based assay to evaluate oocyte post-ovulatory ageing

Battistella A., Andolfi L., Zanetti M., dal Zilio S., Stebel M., Ricci G. and Lazzarino M.
In preparation

2. Presentazioni a conferenze. (IOM; Elettra; Udine; Burlo)

Regional Biophysical Conference, Zreče, Slovenia 2018

- Loredana Casalis: *Cell Biomechanics as a marker of disease development*

International School di Nanoscale Optical Microscopy, Venezia 2018

- Loredana Casalis: *Atomic Force Microscopy: Imaging Biological Matter at High Resolution*

The Yellow Seminars, Trieste, 11/5/2018.

- Daniela Cesselli: *The role of exosomes in the communication between cancer cells and cancer microenvironmental cells*

XXI Annual Linz Winter Workshop, Linz 29/01/19 -04/02/19

- Alice Battistella (CNR-IOM): *AFM Investigation of the Mechanical Properties of Mouse Oocytes*
- Gesmi Milkovich (Elettra): *Biomechanical cues towards cancer tissues characterization*

Mini-workshop on Extracellular Vesicles: From biophysical properties to therapeutic applications, Trieste, 10-11 Aprile 2019.

- Daniela Cesselli: *Role of exosomes in the crosstalk between glioma stem cells and their tumor microenvironment*

Biophysics@Rome 15-16/05 2019

- Alice Battistella : *AFM Investigation of the Mechanical Properties of Mouse Oocytes*
- Marco Lazzarino: *Microfabricated cantilevers for parallelized cell-cell adhesion measurements*
- Laura Andolfi: *Investigation of Adhesion and Mechanical Properties of Human Glioma Cells by Atomic Force Microscopy*

XXIII Congresso Nazionale e Corso residenziale AINO, Udine 10-12/11 2019

- Marco Lazzarino: *Investigation of Adhesion and Mechanical Properties of Human Glioma Cells by Atomic Force Microscopy*
- Ivana Manini: *Identificazione delle differenti caratteristiche, in vitro, di una popolazione di cellule staminali residenti nel microambiente dei glioblastomi (gasc) isolate da tre regioni con diversa positività per 5-ala (acido 5-aminolevulinico), in interventi chirurgici adiuvati dall'uso di coloranti fluorescenti*
- Michela Bulfoni: *Ottimizzazione di un pannello NGS per la caratterizzazione molecolare dei glioblastomi e delle cellule staminali tumorali da essi ottenuti*
- Federica Caponnetto: *"Come inibire l'interazione tra cellule staminali tumorali e microambiente tumorale? Studio del profilo lipidico, immunofenotipico e genomico delle vescicole extracellulari secrete da cellule staminali di glioblastoma e della componente stromale attivata"*
- Daniela Cesselli: *"Gli esosomi rilasciati dalle cellule staminali di glioma (GSC) attivano gli astrociti e ne inducono l'acquisizione di un potenziale staminale attraverso un meccanismo che può essere revertito mediante antagonismo"*
- Daniela Cesselli: *"I periciti come possibile cellula di origine delle cellule staminali associate ai gliomi (GASC)"*

"Brain tumors: from bench to clinic", Lubiana, 26/11/2019

- D. Cesselli: *Novel cellular models and machine learning approaches for a precision medicine approach in glioma*
- M. Bulfoni: *Molecular characterization of glioblastomas and glioma stem cells (GSC) using a targeted home-made NGS panel*
- F. Caponnetto: *Inibizione delle pathways di uptake esosomiale come blocco del cross talk tumore-microambiente*

3) Attività di verifica dei risultati

Milestone 1. Obiettivo e deliverable

Sviluppo di un protocollo per la misura delle proprietà meccaniche degli ovociti: sono stati sviluppati due protocolli (uno per umani e uno per topi) per lo svolgimento delle seguenti operazioni:

- recupero e pulizia degli ovociti
- immobilizzazione su substrato: coating e fabbricazione di substrati nanopatternati
- funzionalizzazione della sonda con microsfero di quarzo o fabbricazione di cantilever custom
- definizione dei parametri di misura
- procedura di analisi delle curve con due o più strati di differente rigidità.
- Definizione dei parametri di misura si stress-rilassamento
- Protocollo di fabbricazione delle sonde per misure si stress-rilassamento
- Parametri di forze da applicare in maniera da non influenzare la degradazione cellulare.

Correlazione tra proprietà meccaniche degli ovociti e grado di maturazione: è stata ottenuta la dipendenza delle proprietà biomeccaniche dall'analisi morfologica nel caso di ovociti umani freschi e congelati. E' stata ottenuta in maniera statisticamente significativa la dipendenza delle proprietà biomeccaniche dal tempo di invecchiamento nel caso di ovociti murini.

Test a doppio cieco in cui tra proprietà meccaniche e morfologiche: è stato eseguito un test a doppio cieco sulle gravidanze portate termine con successo e le proprietà meccaniche di ovociti "fratelli". Tuttavia l'esiguità del campione osservato e la debole dipendenza tra proprietà meccaniche di ovociti gemelli non hanno consentito di trarre risultati affidabili da questo test, anche se i valori statistici sono risultati significativi.

Milestone 2. Obiettivo e deliverable

Identificazione del modello animale e misura dell'influenza delle misure mecano biologica sul rate di successo della fertilizzazione: il modello animale è stato identificato e studiato, le pratiche di prelievo manipolazione e misura degli ovociti sono state sviluppate, test di fertilizzazione sono stati fatti al livello di blastocisti.

Dimostrazione della non influenza delle misure biomeccaniche sull'esito del processo di fertilizzazione: la misura della influenza della misura delle proprietà meccaniche sull'esito della fertilizzazione alla nascita non è stata valutata. Questa attività richiede competenze di riproduzione animale (impianto dell'embrione, allevamento animale e imaging in vivo) che erano disponibili all'inizio del progetto ma che durante lo svolgimento dello stesso sono cambiate. In particolare lo stabulario CBM è passato sotto UniTS con la sostituzione di alcune unità di personale che avevano queste competenze. D'altra parte la valutazione della resa alla nascita dipende da molti parametri e la possibilità che l'insuccesso fosse dovuto non alla misura AFM in se ma alla pratica di impianto e di allevamento non può essere facilmente scartata. Si è preferito quindi valutare la resa al livello di formazione di blastocisti ottenuti con la pratica FIVET, e questo ha permesso di analizzare la resa non solo in risposta alla variabile misure/non misura ma anche in dipendenza dalle proprietà meccaniche degli ovociti.

Infine sono state fatte misure di degradazione degli ovociti in funzione delle stimolazioni applicate e sono stati individuati regimi di forza che non inducono la degradazione dell'ovocita

Il rate di successo di fertilizzazione in vitro tra ovociti misurati e non misurati è statisticamente indistinguibile: Gli ovociti misurati e fertilizzati a un'ora del prelievo mostrano un rate di successo del processo FIVET confrontabile con quello degli ovociti non misurati, nonostante per ottenere la misura sia stata necessaria la rimozione delle cellule del cumulo e quindi la FIVET sia stata effettuata in condizioni non fisiologiche. E' stato altresì dimostrato che il successo della pratica di fertilizzazione FIVET diminuisce con il tempo trascorso dal prelievo ed è parametrizzabile con la misura delle proprietà meccaniche dell'ovocita.

Analisi statistica del successo della fertilizzazione, valutato alla nascita, su modello animale

Come discusso sopra non è stato per scelta, valutato il successo della fecondazione a alla nascita ma a lo stato di blastociti- Il rate di successo è > 50% confrontabile con i valori riportati in letteratura della FIVET

Milestone 3. Obiettivo e deliverable

Analisi della correlazione tra lo stato anagrafico e clinico del donatore di ovocita e proprietà meccaniche degli ovociti. L'approvazione della fecondazione eterologa ha drasticamente ridotto il numero di pazienti che si sottopongono a terapie ormonali per indurre la superovulazione, rendendo poco praticabile questo tipi di indagine per la carenza di campioni. D'altra parte il modello animale è basato su colonie murine sane ed omogenee.

Identificazione di situazioni anagrafiche/cliniche con spettro biomeccanico anomalo.

N/A

La proprietà biomeccaniche di ciascun ovocita di una stessa paziente cadono tutte al di fuori della distribuzione normale

N/A

Analisi numerica

N/A

Milestone 4. Obiettivo e deliverable

Ottimizzazione di tecniche di misure meccaniche con microscopia a forza atomica. Normalizzazione di dati di forza rispetto al tessuto sano:

Utilizzando modelli diversi di tumore, abbiamo dimostrato che con misure quantitative AFM è effettivamente possibile evidenziare delle differenze tra diversi istotipi tumorali. Questo è stato realizzato in via preliminare per campioni murini TMA di cancro al seno che comprendevano tipi molecolari diversi. Le misure sono state rese difficili dalle piccole dimensioni dei campioni, che in un tempo inferiore a quello necessario per l'acquisizione di tutti i dati dell'array (decine di minuti) tendevano a staccarsi dai substrati. La normalizzazione dei dati rispetto a campioni sani è stata invece realizzata nel caso di fettine biotiche di diverse tipologie morfologiche di HGSOc derivate da pazienti. In quel caso il diametro del tessuto era più esteso di circa un 20%, impattando in parte sull'adesione. Vetrini con coating apposito, favorivano poi l'adesione elettrostatica. Con questi accorgimenti abbiamo dimostrato come l'AFM riesca a distinguere le varie architetture tumorali e tra stadio IV e III del tumore (E. Azzalini *et al.*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, in press).

Automatizzazione della misura delle mappe di distribuzione di rigidità e normalizzazione delle stesse:

L'automatizzazione dell'acquisizione delle mappe di distribuzione di rigidità dei tessuti è stata implementata, con l'acquisizione automatica di mappe micrometriche e nanometriche di forza-indentazione della dimensione massima dell'ampiezza della scansione dello scanner piezoelettrico (100 μm x 100 μm).

Riproducibilità delle misure. Test su campioni a rigidità nota:

La riproducibilità delle misure di stiffness è stata testata con successo su campioni di gel di poliacrilamide (PAG) a rigidità variabile, tra 58 e 3 kPa (4 gel, misure in triplicato), un campione di 60 punti distribuiti random sulla superficie del gel è stata misurata ed analizzata con l'AFM. Il valore del gel più rigido 58.04 ± 8.63 kPa (media \pm SD) è stato usato come normalizzatore per gli altri, ottenendo rispettivamente i valori di 28.03 ± 2.66 kPa, 7.20 ± 2.42 kPa and 2.93 ± 0.60 kPa.

Milestone 5. Obiettivo e deliverable

Misure "blind" delle proprietà meccaniche di fettine di tessuto bioptico da pazienti con cancro al seno a diversi stadi di malattia

Nel caso di tumori ad alta eterogeneità, è molto importante decidere da misure di morfologia ottica (con staining) la griglia dove applicare le misure AFM. Date queste premesse, i vari campioni HGSOC sono stati comunque fenotipizzati prima delle misure AFM. Invece, il test sul grado tumorale è stato condotto in modalità blind.

Mappe di distribuzione di rigidità nei tessuti bioptici

Come dimostrato in Figura S4 c, si sono ottenute mappe di rigidità di tessuti bioptici di HGSOC, poi analizzate statisticamente (boxplot Fig. S4 d).

Verifica con tecniche di stadiazione istologica del grado di sviluppo del tumore

Anche la verifica di stadiazione del tumore è stata effettuata con misure AFM forza-distanza, come spiegato sopra.

Marco Lazzarino

Dirigente tecnologo CNR-IOM

Coordinatore scientifico progetto BioMEC



