



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA - ROMAGNA  
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



investiamo nel vostro futuro

### Piattaforma Tecnologica per l'Ingegneria Tessutale, Teranostica ed Oncologia

Al Progetto PON01\_01059 *“Sviluppo di una piattaforma tecnologica per il trattamento non invasivo di patologie oncologiche e infettive basata sull'uso di ultrasuoni focalizzati”*, hanno partecipato il CONSORZIO PITECNOBIO (capofila) e l'ISTITUTO ORTOPEDICO RIZZOLI, l'UNIVERSITA' DI PALERMO e PROMEDICA Srl. Il progetto aveva come obiettivo la realizzazione di nuovi prodotti, processi, servizi volti all'acquisizione di nuove conoscenze relative a piattaforme terapeutiche innovative basate sull'impiego di ultrasuoni ad alta frequenza focalizzati selettivamente sul tessuto bersaglio, sotto guida di Risonanza Magnetica istruita secondo modelli innovativi di interpretazione dell'immagine orientati da approcci di “intelligenza artificiale” (MRgFUS). Il fine ultimo del progetto è stato la messa a punto di protocolli di trattamento non invasivo di lesioni tumorali solide e di infezioni batteriche localizzate su protesi artificiali.

I risultati attesi dal progetto sono stati:

- lo sviluppo di un prototipo sperimentale FUS dedicato alla sperimentazione preclinica su piccoli animali;
- miglioramenti della performance dell'apparecchiatura ottenuti mediante la realizzazione di tools innovativi per la ricerca preclinica e per la somministrazione degli ultrasuoni focalizzati nel tessuto osseo, nel tessuto adiposo, nel fegato e nell'encefalo;
- la messa a punto di un protocollo condiviso di Quality Assurance;
- sistemi per la misura della temperatura cutanea del paziente durante il trattamento; nuove conoscenze valutate su modelli preclinici, sull'efficacia degli ultrasuoni focalizzati su sarcomi, tumori del fegato, tumori del colon, tumori dell'encefalo e infezioni batteriche in forma platonica e sessile;
- nuove conoscenze sull'interferenza degli ultrasuoni focalizzati sulla struttura dei biomateriali utilizzati per le protesi umane.

In particolare, gli obiettivi dell'Istituto Ortopedico Rizzoli nel progetto PON01\_01059, in collaborazione con PROMEDICA SRL ed il Dipartimento di Scienze Radiologiche del Policlinico 'P.Giaccone' (Dir.Prof. Massimo Midiri) dell'Università di Palermo, sono stati quelli di valutare con studi preclinici *in vitro* gli effetti del trattamento con ultrasuoni focalizzati guidati da risonanza magnetica (MRgFUS) sui tessuti dell'apparato muscolo-scheletrico interessati da lesioni tumorali per confermare l'efficacia del trattamento ablativo e per verificare che non determini danni alle strutture periferiche alla lesione trattata. Prima di procedere a valutazioni precliniche in idonei modelli sperimentali, sono state allestite colture di cellule tumorali di linea da osteosarcoma, e di cellule mesenchimali staminali umane sane per valutare l'efficacia sulle lesioni tumorali e di limitazione al danno delle cellule sane. Questi studi sono stati condotti in collaborazione la Ditta PROMEDICA SRL ed il Dipartimento di Scienze Radiologiche del Policlinico 'P.Giaccone' (Dir.Prof. Massimo Midiri) dell'Università di Palermo.

***Valutazione degli effetti dell'esposizione ad ultrasuoni focalizzati (HIFU) di cellule di osteosarcoma (Mg-63 e Soas-2) mediante saggi di vitalità cellulare e di espressione.***



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA - ROMAGNA  
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



UNIONE EUROPEA  
Fondo europeo di sviluppo regionale



investiamo nel vostro futuro

### Piattaforma Tecnologica per l'Ingegneria Tessutale, Teranostica ed Oncologia

I risultati hanno mostrato come le due linee cellulari rispondano in maniera differente ai diversi livelli di energia acustica applicati durante il trattamento HIFU durante il tempo sperimentale di osservazione (massimo 14 giorni dal trattamento HIFU). Infatti, mentre l'esposizione a basse dosi di energia (200-400J), corrispondenti alle aree lontane 2-5 mm dal punto focale (oggetto del trattamento FUS), non determinava alcuna sostanziale variazione della vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato, il trattamento con dosi maggiori (500-630J), similari a quelle applicate nel punto focale, provocava una riduzione significativa della vitalità cellulare, fino alla morte cellulare, per effetto del danno termico generato, più evidente all'energia acustica di 630J. Allo stesso modo per valutare se il trattamento con MRgFUS possa avere degli effetti sui pathway molecolari che governano il differenziamento osteoblastico, le stesse linee cellulari sottoposte alle differenti energie acustiche sono state analizzate per i profili di espressione genica del principale gene coinvolto nel differenziamento osteoblastico (*RUNX2*) e di alcuni markers osteoblastici (ad es. *ALPL* e *BGLAP*). I risultati di queste analisi evidenziano come non ci siano differenze nell'espressione genica di *RUNX2* derivante dall'esposizione delle cellule di osteosarcoma alle differenti energie acustiche. Le Mg-63 presentano globalmente bassi valori di espressione genica di *RUNX2*, prossimi al controllo non trattato, mentre nelle Saos-2 *RUNX2* è leggermente sovra espresso senza differenze significative tra le energie acustiche applicate. Per quanto riguarda le espressioni di *ALPL* e *BGLAP*, si è osservato, in entrambe le linee cellulari di osteosarcoma, bassi livelli di espressione nelle colture esposte alle frequenze di 200-400J (lontano dal fuoco) e superiori al controllo in quelle esposte a 500-630J.

I risultati di espressione genica sono in accordo con quelli di vitalità cellulare e suggeriscono che vi possa essere la possibilità che una sottopopolazione di cellule di osteosarcoma possa resistere all'esposizione agli ultrasuoni focalizzati ad alte intensità nelle aree lontane dal fuoco (cut-off 500J), dove si ha più una prevalenza degli effetti meccanici rispetto a quelli termici, mantenendo o peggiorando lo stato indifferenziato, e quindi rappresentando una possibile fonte di recidiva locale della lesione tumorale o di possibile diffusione metastatica. Questo fenomeno, a nostro parere, dovrebbe essere approfondito anche su altre linee cellulari di osteosarcoma, e valutato anche in specifici modelli *in vivo* per poter implementare i protocolli terapeutici di ablazione delle lesioni tumorali ossee con MRg-FUS.

- Agnese V, Scoarughi GL, Costa V, Corso C, Carina V, De Luca A, Bellavia D, Raimondi L, Pagani S, Midiri M, Stassi G, Alessandro R, Fini M, Barbato G, Giavaresi G. FOCUSED ULTRASOUND EFFECTS ON OSTEOSARCOMA CELL LINES. (*to be submitted to Ultrasound Med Biol*).

### **Studi Preclinici in vivo**

Nel corso del progetto l'ISTITUTO ORTOPEDICO RIZZOLI ha fornito consulenza scientifica per la realizzazione di un prototipo sperimentale MRg-FUS dedicato alla sperimentazione preclinica su piccoli animali, per migliorare la *performance* di tale apparecchiatura con la realizzazione di *tools* innovativi per la ricerca preclinica e per la stesura di protocollo



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA - ROMAGNA  
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



investiamo nel vostro futuro

### Piattaforma Tecnologica per l'Ingegneria Tessutale, Teranostica ed Oncologia

sperimentale preclinico in un modello murino presentato in collaborazione con l'Università di Palermo. Malgrado l'importante scostamento temporale rispetto al capitolato tecnico derivante dall'applicazione della legge 24/2016, l'interesse scientifico è tale che lo studio sarà completato anche a progetto concluso non appena sarà ottenuta l'autorizzazione dal Ministero della Salute. L'obiettivo del protocollo sperimentale in vivo è quello di valutare l'efficacia del trattamento con MRgFUS sulle lesioni metastatiche ossee da mieloma multiplo (MM) indotte in un modello sperimentale murino non immunocompetente (NOD/SCID). In anestesia generale, in tutti gli animali saranno inoculate nella metafisi prossimale della tibia sinistra, cellule di MM in presenza o meno di una miscela di esosomi di MM. Ad intervalli regolari, verranno sottoposti ad indagine radiografiche e di imaging (LUMINA IVIS e FMT, Perkin Elmer) per valutare lo sviluppo e l'estensione delle lesioni osteolitiche indotte. Al raggiungimento dell'estensione delle lesioni ossee di circa il 60%, si procederà in anestesia generale al trattamento con MRgFUS. Raggiunto il tempo sperimentale di 14 giorni, dopo eutanasia farmacologica in anestesia generale, verranno effettuate indagini istomorfometriche.

Preliminarmente, sono stati condotti studi *in vitro* utili alla definizione del protocollo sperimentale *in vivo*, volti alla valutazione del ruolo degli esosomi, elementi cellulari secreti dalle cellule di MM, nel differenziamento di precursori osteoclastici. Quindi, sono stati messi a punto esperimenti di internalizzazione degli esosomi isolati e opportunamente marcati nelle cellule bersaglio opportunamente scelte: la linea murina macrofagica ampiamente usata come modello pre-osteoclastico è la Raw264.7. Le analisi effettuate hanno dimostrato che le cellule di MM producono attivamente esosomi che riconoscono e vengono internalizzati dalle cellule bersaglio Raw264.7. Le cellule Raw264.7, così come una coltura primaria umana di pre-osteoclasti, sono state incubate per un periodo di sei giorni con gli esosomi di MM e si è quindi valutato l'effetto del trattamento sul differenziamento osteoclastico. Saggi di espressione genica e approcci biochimici hanno dimostrato un significativo incremento dell'espressione dei geni correlati con il differenziamento osteoclastico (TRAP, CTSK, MMP9), ancora più evidenti in una valutazione dose dipendente. In ogni caso, il ruolo positivo svolto dagli esosomi di MM nell'induzione del differenziamento osteoclastico è principalmente riconducibile a esosomi isolati da due linee di MM: U266 e MM1s. Nel complesso, le attività sperimentali svolte nell'ambito degli studi preclinici *in vitro* forniscono la prova che gli esosomi derivati da cellule di MM favoriscono il reclutamento dei precursori osteoclastici, sostengono la loro sopravvivenza e esercitano effetti pro-differenziativi sugli stessi, favorendo di conseguenza l'insorgenza delle lesioni osteolitiche nel MM.

- Raimondi L, De Luca A, Amodio N, Manno M, Raccosta S, Taverna S, Bellavia D, Naselli F, Fontana S, Schillaci O, Giardino R, Fini M, Tassone P, Santoro A, De Leo G, Giavaresi G, Alessandro R. Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation. *Oncotarget*. 2015 May 30;6(15):13772-89.



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA - ROMAGNA  
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



investiamo nel vostro futuro

#### Piattaforma Tecnologica per l'Ingegneria Tessutale, Teranostica ed Oncologia

- Raimondi L, De Luca A, Morelli E, Giavaresi G, Tagliaferri P, Tassone P, Amodio N. MicroRNAs: Novel Crossroads between Myeloma Cells and the Bone Marrow Microenvironment. Biomed Res Int. 2016; 2016: 6504593. doi: 10.1155/2016/6504593.

#### ***Valutazione degli effetti dell'esposizione di cellule staminali mesenchimali (hMSC) a stimolazioni ultrasonore non focalizzate ma a bassa intensità e pulsate (LIPUS) al fine di simulare quello che accade alla periferia di una lesione trattata con FUS.***

Simulando gli effetti meccanici derivanti dal propagarsi dell'onda ultrasonora oltre la zona lontana dal punto focale, ossia quelli ipoteticamente presenti nel tessuto sano circostante la lesione tumorale trattata, si è osservato che per frequenze LIPUS variabili da 650 kHz a 4.5 Mhz (inversamente proporzionali alla distanza dal punto focale), non ci sono differenze significative nella vitalità cellulare tra le energie acustiche a tempi di trattamento brevi (5 m), mentre a tempi più prolungati (20 m) si è osservata una riduzione della vitalità cellulare inversamente proporzionale all'energia acustica. Inoltre, si è osservato un modesto incremento dell'espressione genica di *RUNX*, *ALPL* e *BGLAP* alle frequenze acustiche più alte, che sembrano quindi stimolare il differenziamento della cellula mesenchimale in senso osteoblastico anche oltre la frequenza di 1.5MHz già utilizzata in clinica per migliorare il consolidamento delle fratture.