



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E**

**DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia molecolare e applicata (LM-6)**

---

**La spettroscopia FTIR imaging: un nuovo approccio per  
lo studio delle lesioni uterine in ambito umano**

**FTIR imaging: a new probe to study human uterine lesion**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:

Greta Discepoli

Relatore  
Chiar.ma Prof.ssa

Elisabetta Giorgini

Correlatrice

Pasquapina Ciarmela

**Sessione straordinaria febbraio 2025  
Anno Accademico 2023/24**

# **INDICE**

## **1 INTRODUZIONE**

### **1.1 Anatomia dell'utero umano**

### **1.2 Lesioni tumorali benigne e maligne**

### **1.3 Leiomiomi uterini**

#### **1.3.1 Epidemiologia**

#### **1.3.2 Fattori di rischio**

#### **1.3.3 Carcinogenesi e diagnosi**

### **1.4 Leiomiosarcomi uterini**

#### **1.4.1 Epidemiologia**

#### **1.4.2 Fattori di rischio**

#### **1.4.3 Stadiazione e diagnosi**

### **1.5 Collagene: struttura e funzione**

### **1.6 Spettroscopia infrarossa**

#### **1.6.1 Principi teorici**

#### **1.6.2 Interpretazione dello spettro IR di sistemi biologici**

#### **1.6.3 Spettri IR di campioni biologici e analisi FTIR Imaging**

## **2 SCOPO DELLA TESI**

## **3 PARTE SPERIMENTALE**

### **3.1 Raccolta e preparazione dei campioni**

### 3.2 Analisi istologica

### 3.3 Acquisizione delle mappe IR

#### 3.3.1 Strumentazione e spettro IR

#### 3.3.2 Acquisizione delle mappe IR

### 3.4 Analisi delle mappe IR

#### 3.4.2 Analisi multivariata

#### 3.4.3 Analisi univariata

## 4 RISULTATI

### 4.1 Confronto fra i dati istologici e spettrali relativi al leiomiosarcoma LMS e ai leiomiomi CL, US, BZ e AP

#### 4.1.1 Analisi istologica

#### 4.1.2 Analisi imaging delle mappe IR

#### 4.1.3 Analisi multivariata

#### 4.1.4 Analisi spettrale

#### 4.1.5 Analisi univariata

### 4.2 Analisi imaging delle regioni intra, peri ed extratumorale nel leiomioma Cellular

#### 4.2.1 Analisi imaging delle mappe IR

#### 4.2.2 Analisi multivariata

#### 4.2.3 Analisi univariata

- 5    DISCUSSIONE
- 6    CONCLUSIONI
- 7    BIBLIOGRAFIA

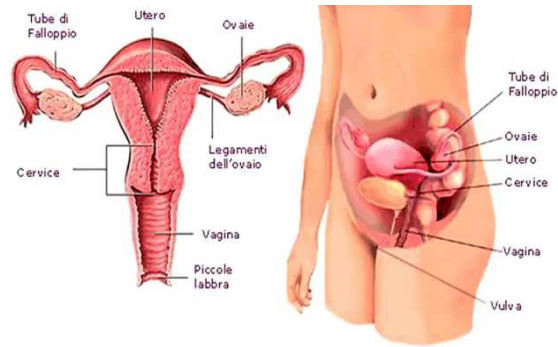
# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 Anatomia dell'utero

L'utero è un organo muscolare cavo piriforme localizzato al centro della piccola pelvi, precisamente tra la vescica e il retto, in continuità nella porzione superiore con le tube uterine e connesso all'esterno tramite il canale vaginale. La lunghezza totale dell'utero è di circa 6-8 cm ma tali misure sono soggette a notevoli variazioni nel corso della vita della donna. I due terzi superiori dell'utero costituiscono il corpo che termina con un restringimento (istmo), mentre il terzo inferiore è la cervice.

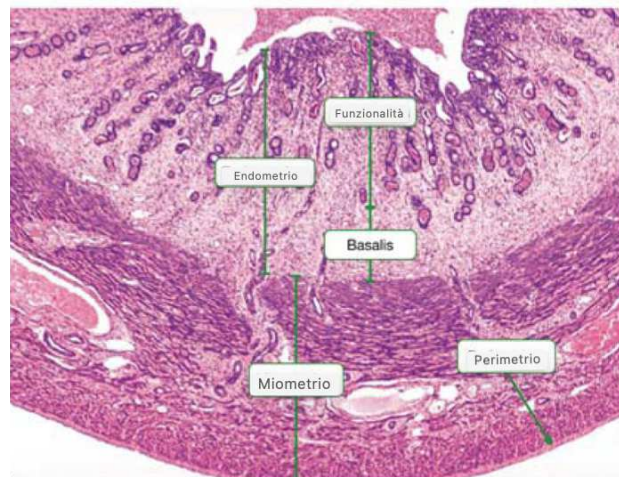
Il corpo dell'utero presenta una cavità triangolare a vertice inferiore e appiattita in direzione anteroposteriore; dai vertici superiori si diparte il lume delle tube uterine mentre il vertice inferiore continua con il canale cervicale.

La cervice ha un aspetto cilindrico e possono essere distinte due porzioni, ben demarcate dalla presenza dell'istmo uterino; una porzione sopravaginale, che si estende dall'istmo all'inserzione dei fornicati vaginali e una porzione vaginale che presenta l'orifizio esterno dell'utero (Figura 1.1) (Martini et al., 2012).



**Figura 1.1:** Anatomia dell'utero (<https://medicinaonline.co/2017/12/18/>).

La parete uterina, che ha uno spessore medio di 1-2 cm, è costituita, dall'interno verso l'esterno, da una tonaca mucosa (endometrio), da una tonaca muscolare (miometrio), e da una tonaca sierosa (perimetrio) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** Morfologia dell'utero; endometrio, miometrio e perimetrio (O. Adenomyosis et al., 1925).

L'endometrio può essere considerata la tonaca più dinamica dell'utero, in quanto, è un bersaglio degli ormoni secreti dall'ovaio e va incontro a modificazioni cicliche che caratterizzano le fasi del ciclo mestruale. Strutturalmente è costituito da un epitelio di rivestimento batiprismatico ciliato e da una lamina propria.

L'epitelio di rivestimento è composto da un singolo strato di cellule ciliate, intervallate da cellule secernenti muco. La lamina propria, invece, è formata da tessuto connettivale giovane, ricco di cellule in grado di proliferare con facilità e con numerose ghiandole tubulari semplici che producono un secreto ricco di glicoproteine e glicogeno.

L'endometrio è ulteriormente distinto in una parte profonda e una basale. La parte profonda è formata dallo strato basale costituito da tessuto connettivo scuro che presenta le cellule staminali endometriali che rigenerano lo strato funzionale soprastante e, per tale motivo, è una struttura permanente che non viene eliminata con le mestruazioni. La parte superficiale è uno strato funzionale costituito da tessuto connettivo chiaro ed è la porzione espulsa con le mestruazioni e rigenerata ad ogni ciclo mestruale. (Anastasi et al., 2006).

Il miometrio è la tonaca muscolare dell'utero, con spessore di 1 cm ed è composta da fibrocellule muscolari lisce intervallate da uno stroma fibroso che ne accresce la consistenza. Si può suddividere in strato interno, costituito da fasci di fibre longitudinali; uno strato medio, con fasci obliqui o circolari e, infine, lo strato esterno, caratterizzato da fasci a decorso longitudinale (Ono et al., 2014).

Infine, il perimetrio che è la tonaca sierosa dell'organo; presenta la struttura tipica del peritoneo ed è unito al miometrio per mezzo di un sottile strato sottosieroso ed è più sviluppato nel collo uterino.

## **1.2 Lesioni benigne e maligne**

I tumori ginecologici colpiscono l'apparato riproduttivo femminile e si dividono in tumori dell'utero e tumori delle ovaie. L'utero può essere colpito da numerose forme tumorali benigne e maligne, ovvero tumore epiteliale benigno (polipi endometriali o iperplasia dell'endometrio), tumore connettivale benigno (leiomioma e adenoma), tumore epiteliale maligno (carcinoma) e tumore connettivale maligno (sarcoma). Con il termine tumore benigno si intende un ammasso di cellule considerate tumorali perché si moltiplicano più del dovuto. Si tratta però di cellule che presentano ancora le caratteristiche del tessuto d'origine e che tendenzialmente non invadono i tessuti circostanti e non producono metastasi. Ciò nonostante, la presenza di tali neoplasie può provocare sintomi anche gravi, tali da richiedere trattamenti sia farmacologici che chirurgici (Ferrero, 2021).

Il tumore dell'utero può insorgere a livello del corpo uterino, la parte superiore dell'utero, oppure a livello del collo o cervice uterina, la parte inferiore in diretta continuazione con la vagina.

Nella quasi totalità dei casi i tumori del corpo uterino nascono dalle cellule dell'endometrio (adenocarcinomi endometriali) mentre solo in una piccola percentuale derivano da cellule della componente muscolare o connettivale (sarcomi uterini).

Gli adenocarcinomi endometriali sono rappresentati nell'80% dei casi dalla forma endometrioide, mentre altre forme più rare e aggressive sono il carcinoma sieroso, il carcinoma a cellule chiare, l'adenocarcinoma mucinoso, il carcinoma indifferenziato e il carcinosarcoma. Il carcinoma endometriale origina da tessuti ghiandolari e tessuti connettivi dell'endometrio, che è il rivestimento dell'utero.

I tumori endometriali sono più frequenti nelle donne in età adulta dopo la menopausa, con un picco di incidenza dopo i 50 anni di età. Infine, i sarcomi dell'utero, che colpiscono lo strato esterno del corpo uterino, composto da cellule muscolari, possono essere sarcomi endometriali stromali, che derivano dal tessuto connettivo dell'endometrio e rappresentano l'1% dei tumori uterini, o leiomiomasarcomi uterini derivanti dal miometrio che saranno oggetto di approfondimento di questa tesi (Nappi, 2005).

Per il tumore dell'endometrio sono stati identificati diversi fattori di rischio, in generale, tutte le condizioni che fanno crescere l'esposizione agli estrogeni, tra cui obesità, dato che l'aumento di tessuto adiposo può provocare uno squilibrio nel rapporto tra estrogeni e progesterone, un inizio precoce del ciclo mestruale, una menopausa tardiva e l'assenza di gravidanze. Al contrario, l'utilizzo della pillola anticoncezionale, costituita da un dosaggio bilanciato di estrogeni e progesterone, rappresenta un fattore protettivo.

Ulteriori fattori di rischio sono l'età, in quanto è un tumore tipico delle pazienti al di sopra dei 50 anni, il diabete mellito e l'ipertensione, che aumentano di circa 3-4 volte il rischio di sviluppare il tumore rispetto alla popolazione generale. Anche la storia familiare può suggerire un aumentato rischio di tumore dell'endometrio. In particolare, la sindrome di Lynch porta a un notevole incremento del rischio di sviluppare un tumore dell'endometrio nel corso della vita (Raglan et al., 2019).

Per quanto riguarda il tumore della cervice uterina, l'infezione da Human Papilloma Virus (HPV) rappresenta il fattore di rischio più importante associato. Sono riconosciuti altri fattori di rischio tra cui, una età precoce del primo rapporto sessuale, indebolimento del sistema immunitario, fumo e uso a lungo termine della pillola anticoncezionale (Castellsagué, 2008).

Tra le lesioni benigne, sono di interesse anche i polipi endometriali che sono escrescenze eccessive di ghiandole endometriali che si formano nel rivestimento interno dell'utero e sporgono dalla cavità uterina. Possono essere singoli o multipli, sessili o peduncolati e sono solitamente piccoli, spesso asintomatici ma possono anche causare sanguinamento uterino anomalo, soprattutto tra un ciclo mestruale e l'altro o dopo la menopausa.

Ne sono affette circa il 20–30% delle donne e sono state ipotizzate numerose cause associate alla comparsa dei polipi endometriali; esse comprendono fattori

genetici ed eredo-familiari, fattori infiammatori, fattori endocrini, e fattori iatrogeni, come un'estrogenoterapia non bilanciata.

La diagnosi può essere effettuata a livello macroscopico con l'utilizzo di diverse tecniche, come l'ultrasonografia transvaginale, dalla quale si può osservare una lesione con contorni regolari all'interno della quale sono visibili le ghiandole cistiche. L'isteroscopia permette un'immediata conferma diagnostica e fornisce informazioni necessarie per programmare il corretto approccio terapeutico. Il motivo di una rimozione dei polipi endometriali per via isteroscopia è la risoluzione della sintomatologia, ma anche quello di poter escludere con assoluta certezza una eventuale trasformazione neoplastica (Mansour, 2023).

Altra forma di lesione benigna dell'utero è rappresentata dall'adenoma che è un aggregato nodulare circoscritto di ghiandole endometriali benigne circondate da stroma endometriale con muscolatura liscia leiomiomatosa confinata dallo stroma endometriale. L'adenomioma può localizzarsi nel miometrio, può coinvolgere o originarsi dall'endometrio o formare polipi. Anche in questo caso il sintomo più comune associato alle lesioni è l'abbondante sanguinamento vaginale e gli adenomiomi sono spesso associati ad altre lesioni nell'utero come fibroidi e adenomiosi (Habiba et al., 2019). Infine, il leiomioma che verrà approfondito successivamente.

### **1.3 Leiomiomi uterini**

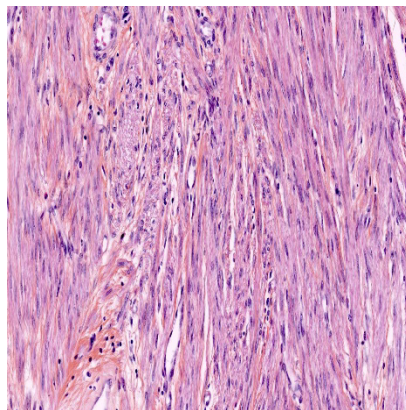
I leiomiomi uterini sono tumori benigni che si sviluppano dall'espansione clonale di una singola cellula del miometrio nel caso in cui quest'ultima subisce alterazioni genetiche sotto l'influenza di ormoni gonadici come progesterone ed estradiolo. Sono caratterizzati dall'aumentata proliferazione di cellule muscolari lisce disordinate, da un'alterata disposizione di matrice extracellulare (ECM) e da una maggiore risposta agli ormoni sessuali steroidei. Una caratteristica distintiva, oltre alla sovrapproduzione della ECM, è la natura fibrosa disorganizzata della matrice, infatti, rispetto al tessuto miometriale, i profili proteici della matrice di leiomioma includono un aumento di collagene, fibronectina e proteoglicani. Diversi studi hanno anche trovato un aumento dell'attivazione delle vie coinvolte nella produzione di ECM, tra cui il fattore di crescita trasformante- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3), CD24 e il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) (McWilliams e Chennathukuzhi, 2017).

Le dimensioni, la forma e le localizzazioni dei leiomiomi possono variare ampiamente nelle donne affette. Per tale motivo, i leiomiomi possono essere classificati in base alla localizzazione in sottomucosi (se si formano a livello della superficie interna della parete uterina), sottosierosi (a livello della superficie esterna), intramurali (nello spessore della parete stessa) o peduncolati (esternamente alla struttura uterina e collegati ad essa attraverso un lembo

tissutale). Tuttavia, non sono escluse le posizioni extra-uterine, di fatto, essendo una patologia che si sviluppa dallo strato muscolare liscio, può sorgere in diversi altri siti del corpo, anche se l'utero rimane il più colpito.

Da un punto di vista istologico, il leiomioma uterino può essere classificato in base al suo aspetto e alle sue proprietà microscopiche. Tra gli istotipi conosciuti, quelli analizzati in questa tesi sono: *usuale*, *cellulare*, *bizzarro* e *apoplettico*.

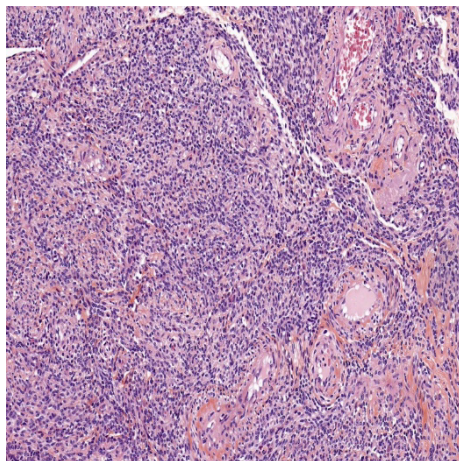
I leiomiomi *usuale* (US) sono generalmente lesioni ben circoscritte costituite da cellule del fuso monomorfe disposte in fascicoli intrecciati. Questi fascicoli sono separati da quantità di collagene ialinizzato che possono suddividere il tumore in noduli. Le cellule si presentano allungate con citoplasma eosinofilo abbondante e nuclei uniformi (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Immagine istologica del leiomioma *Usuale* (Croce et al., 2021).

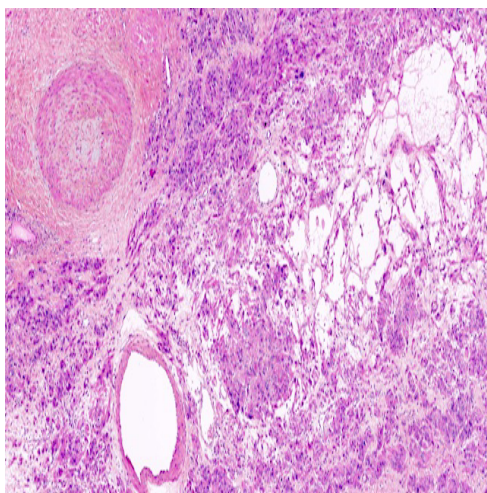
I leiomiomi *cellulare* (CL) sono caratterizzati da una densità cellulare maggiore di forma arrotondata e con scarso citoplasma. Hanno una disposizione fascicolare meno apparente e la presenza di fessure e vasi sanguigni sono caratteristiche

evidenti di questo istotipo. Si estende irregolarmente nel miometrio adiacente e questo lo rende di difficile distinzione dai tumori stromali endometriali e dai leiomiosarcomi (Figura 1.4).



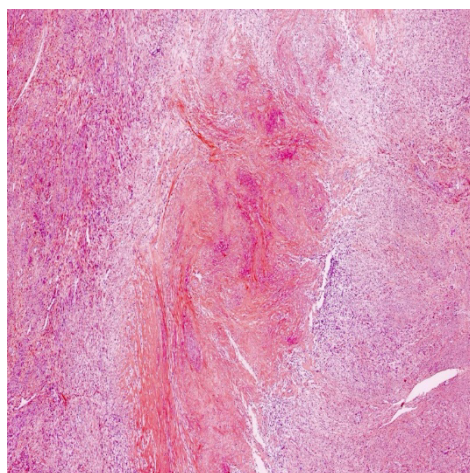
**Figura 1.4:** Immagine istologica del leiomioma *Cellulare* (Alran et al., 2021).

La variante *bizzarro* (BZ) contiene un significativo numero di cellule con un citoplasma eosinofilo e nuclei ipercromatici singoli o multipli. Si osserva un cambiamento degenerativo dei vasi sanguigni accompagnato da infiammazione cronica (Figura 1.5).



**Figura 1.5:** Immagine istologica del leiomioma *Bizzarro* (Alran et al., 2021).

Infine, l'*apoplettico* (AP) si presenta nei pazienti che assumono un farmaco ormonale contraccettivo contenente il progestinico noretindrone per diversi anni. È spesso sintomatico con dolori addominali e molteplici emorragie. Microscopicamente è caratterizzato da zone stellate emorragiche ed edema all'interno dei noduli della muscolatura liscia. Sono frequenti vasi sanguigni anormali e il riconoscimento di queste caratteristiche evita un'errata diagnosi come leiomiosarcoma (Nafussi, 2004) (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Immagine istologica del leiomioma *Apoplectic* (Alran et al., 2021).

Oltre al loro impatto sulla qualità della vita delle donne, un onere importante riguarda l'impatto economico di queste neoplasie ginecologiche sui sistemi sanitari nazionali, che aumenta nel corso degli anni: negli ultimi anni, i costi annuali stimati relativi ai fibromi uterini hanno superato i 34 miliardi di dollari solo negli Stati Uniti, ma non meno in Europa, dove i ricoveri, per lo più a causa di isterectomie, costano oltre 86 milioni di dollari in Inghilterra e anche più di 340

milioni di dollari in Germania (Giuliani et al., 2020). Queste prove suggeriscono l'urgente necessità di concentrare la ricerca non solo su trattamenti terapeutici e farmacologici mirati, ma anche sulla prevenzione dell'insorgenza di queste lesioni aumentando la consapevolezza fin dalle giovani donne.

### *1.3.1 Epidemiologia*

I fibromi uterini sono il tumore benigno più comune del tratto genitale femminile. Tuttavia, la loro vera prevalenza è probabilmente sottovalutata, perché tali studi si sono concentrati sulle donne sintomatiche lasciando un'ampia percentuale di donne asintomatiche o che sottostimano i propri sintomi. La prevalenza varia dal 4,5% al 68,6% a seconda dei paesi e ai dati demografici razziali della popolazione studiata. Una recente ricerca condotta negli Stati Uniti ha dimostrato che i fibromi vengono rilevati in più dell'80% delle donne di origine africana, in quasi il 70% delle donne bianche di età superiore ai 50 anni ma sono presenti poche evidenze nelle donne ispaniche e asiatiche (Giuliani et al., 2020).

In particolare, l'incidenza dei fibromi uterini all'età di 35 anni è risultata essere del 60% tra le donne afroamericane, aumentando più dell'80% all'età di 50 anni, mentre le donne caucasiche hanno un'incidenza del 40% all'età di 35 anni e di quasi il 70% all'età di 50 anni (Baird et al., 2003).

Questi risultati sono in accordo con il Black Women's Health Study (BWHS), ovvero uno studio prospettico di coorte condotto su 60.000 donne afroamericane di età compresa tra 21 e 65 anni che ha fornito una solida base per ulteriori analisi epidemiologiche sulla differenza nei fattori di rischio (Pavone et al., 2018).

### *1.3.2 Fattori di rischio*

I fattori di rischio che predispongono all'insorgenza del leiomioma sono di vario tipo e includono l'età, la razza, i fattori ormonali endogeni ed esogeni, l'obesità, l'infezione uterina e lo stile di vita (la dieta, il consumo di caffeina e alcol, l'attività fisica, lo stress e il fumo). L'età è un significativo fattore di rischio dato che la presenza di leiomiomi aumenta con l'aumentare dell'età e raggiunge un picco di 62,7 per 10.000 tra le donne di età compresa tra 45 e 49 anni; non si verificano casi prima della pubertà e decrescono a 31,8 per 10.000 tra le donne di età compresa tra 50 e 54 anni. Questa condizione rispecchia la storia naturale dei fibromi dato che la maggior parte cresce nel tempo e, di conseguenza, ci si aspetta che vengano diagnosticati in numero maggiore in età avanzata.

Come già visto, l'incidenza di fibromi è maggiore nelle donne afroamericane rispetto alle donne caucasiche. Questo perché la disparità razziale nell'incidenza e nel comportamento biologico dei leiomiomi suggerisce che razze diverse possono implicare differenze nella biosintesi e nel metabolismo degli estrogeni.

Le donne afroamericane hanno mostrato una maggiore probabilità per alcuni fattori di rischio noti, tra cui l'età precoce del menarca e una maggiore probabilità di obesità. Tuttavia, in uno studio le donne afroamericane partecipanti hanno anche ottenuto punteggi più bassi su altri fattori di rischio, tra cui il fumo e un minor consumo di carne rossa (McWilliams e Chennathukuzhi, 2017).

È ben noto che i leiomiomi sono sensibili agli ormoni steroidei sessuali, per questo, le cellule in vivo e i leiomiomi in coltura dipendono dalla stimolazione degli ormoni, in particolare degli estrogeni, per la crescita e lo sviluppo. Infatti, i leiomiomi possono diventare sintomatici a partire dalla pubertà, quando i livelli di estrogeni endogeni aumentano e regrediscono dopo la menopausa quando gli ormoni steroidi iniziano a decrescere. Inoltre, le concentrazioni locali del tessuto uterino di ormoni e recettori ormonali differiscono tra leiomioma e tessuto miometriale sano, ovvero i leiomiomi hanno concentrazioni più elevate di estradiolo, aromatasi, recettore del progesterone (PR) e recettore degli estrogeni- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ). Mentre il miometrio normale ha una risposta limitata agli estrogeni e diventa pressoché assente nella fase luteale, il tessuto tumorale mostra un aumento dei geni regolati dagli estrogeni nella fase luteale. Oltre a questa perdita di regolazione temporale da parte degli estrogeni, il tumore cresce anche in risposta al progesterone, che in genere ha un effetto soppressivo sul miometrio. Non è ancora chiaro però quando si verifica nel fibroma questo cambiamento nella

sensibilità agli ormoni steroidei sessuali. Mettendo in relazione il fattore ormonale con il fattore razziale si è visto che le donne afroamericane hanno livelli di estradiolo più alti del 18% rispetto alle caucasiche e nessuna differenza nei livelli di progesterone.

Oltre ai fattori ormonali, sono considerevoli anche i fattori riproduttivi; infatti, diversi studi hanno registrato un effetto protettivo della gravidanza sullo sviluppo dei fibromi. Questo è dovuto al forte aumento e diminuzione nella produzione di estrogeni e progesterone associati alla gravidanza.

Tra i fattori di rischio è da considerare anche l'alterazione dei geni come MED12, HMGA2, CYP1A1 e CYP1B1, protooncogeni, vie di segnalazione e meccanismi epigenetici. Infatti, sebbene si ritenga che i leiomiomi siano piuttosto stabili dal punto di vista cromosomico, circa il 40% e 50% dei leiomiomi presenta anomalie citogenetiche, come la trisomia 12, i riarrangiamenti di 12q, 6p, 10q e 13q e le delezioni di 7q, 3q e 1p. Tra le alterazioni genetiche, la più comune è la mutazione della subunità 12 del complesso mediatore MED12 che è un regolatore trascrizionale che collega le sequenze regolatorie del DNA al complesso di inizio della RNA polimerasi II. L'inattivazione di MED12 provoca l'upregolazione del fattore di crescita trasformante b (TGF-b), che ha un effetto sui geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione del collagene e sull'eccessiva formazione di matrice extracellulare, caratteristica dei fibromi.

Un modesto aumento del rischio di fibromi è associato ad un alto indice di massa corporea (BMI), infatti, una maggiore incidenza di fibromi trattati chirurgicamente è correlata a donne che hanno assunto più di 20 kg rispetto alle donne che hanno assunto meno di 10 kg e un rischio ridotto è stato riscontrato in coloro che hanno perso peso. Per tale motivo, l'obesità svolge un ruolo come fattore di rischio per i fibromi uterini, agendo attraverso meccanismi ormonali e infiammatori. Questo si deve al fatto che l'obesità è responsabile di un aumento della conversione degli androgeni surrenali in estrone e di una ridotta produzione epatica di globulina legante l'ormone sessuale (SHBG), con conseguente aumento di estrogeni attivi. Ciavattini et al. hanno studiato l'associazione tra la presenza di fibroidi uterini e la distribuzione del tessuto adiposo notando che solo la misurazione ecografica dello spessore del grasso preperitoneale è stata associata alla presenza di fibromi, mentre lo spessore del grasso sottocutaneo non era significativamente associato alla malattia. Questo perché un effetto pro-infiammatorio è più pronunciato nel viscerale rispetto ai compartimenti grassi sottocutanei. Oltre a ciò, l'obesità centrale può promuovere l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia che può influenzare direttamente o indirettamente lo sviluppo dei fibromi promuovendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce miometriali e aumentando i livelli circolanti di ormoni ovarici (Ciavattini et al., 2017).

L'attività fisica, lo stress, la dieta, il fumo, l'alcol e il consumo di caffeina sembrano modulare le vie di segnalazione e i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella crescita dei fibromi. L'esercizio fisico può essere protettivo per i fibromi, anche se pochi studi hanno esaminato questa relazione ma è evidente che nelle donne che fanno esercizio fisico regolare, il rischio di fibromi sembra essere inferiore rispetto alle donne che non fanno esercizio fisico.

Lo stress è un potenziale fattore di rischio fibromico, infatti le esperienze stressanti sono state associate a un alto BMI, obesità, consumo di alcol e pressione sanguigna elevata, tutti fattori che aumentano il rischio di mioma. Inoltre, gli ormoni dello stress possono sovraregolare vari fattori di crescita, citochine e metalloproteinasi della matrice e influenzano anche gli assi ipotalamico-ipofisario-surrenale e gonadi, influenzando così la capacità di biodisponibilità degli estrogeni e aumentando il rischio di sviluppo di fibromi.

Oltre all'obesità anche la dieta potrebbe svolgere un ruolo nel rischio di fibromi uterini. In effetti, alcuni componenti dietetici sembrano modificare il metabolismo ormonale endogeno, in particolare gli effetti degli estrogeni. Di conseguenza, le abitudini alimentari dei diversi paesi potrebbero in parte spiegare la diversa prevalenza dei miomi già osservata. Ad esempio, il contributo predominante degli acidi grassi di origine animale piuttosto che di origine lattiero-casearia nella dieta delle donne afroamericane potrebbe contribuire alla maggiore prevalenza di

fibromi in questa popolazione. Tuttavia, la dieta è una variabile difficile da studiare a causa dei molti fattori confondenti. In uno studio italiano caso-controllo, un consumo significativo di carne bovina e altre carni rosse o prosciutto è stato associato ad un aumento del rischio di fibromi mentre il consumo di pesce ad un rischio ridotto (Chiaffarino et al., 1999).

Questo effetto benefico del pesce è dovuto al fatto che quest'ultimo è un'importante fonte di PUFA omega-3 a catena lunga.

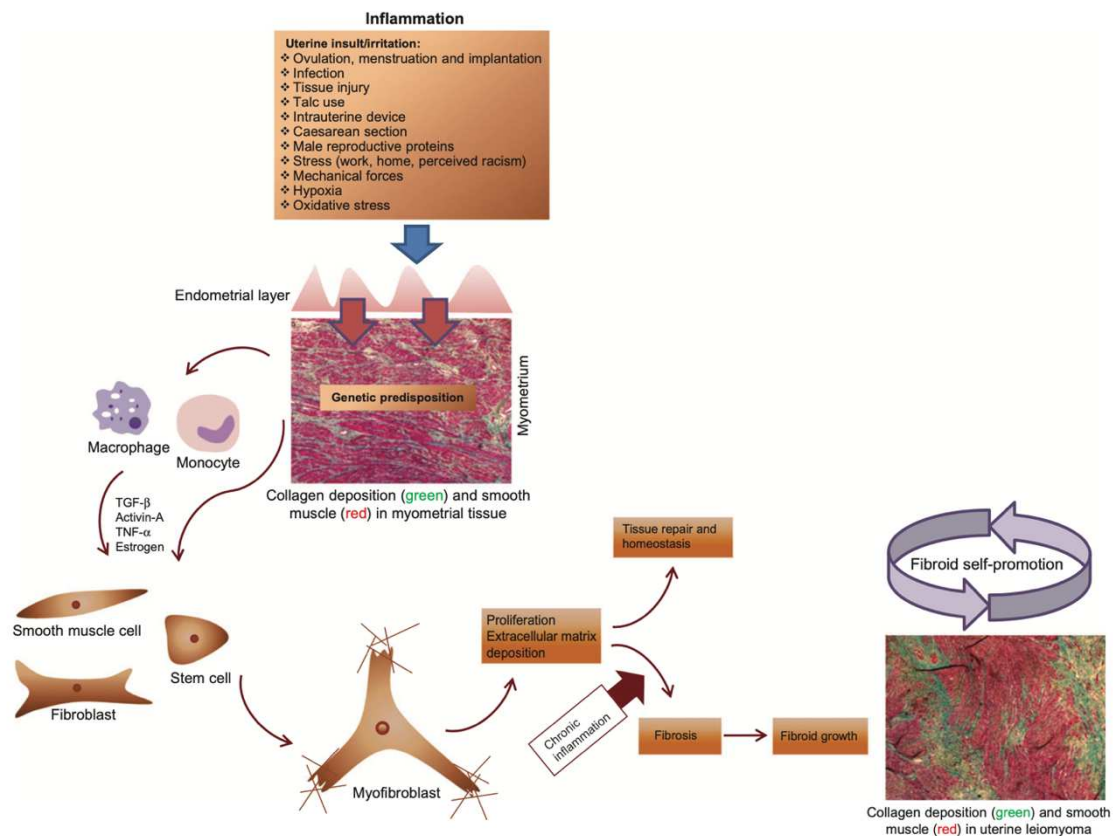
Infine, sono stati effettuati studi epidemiologici che studiano la relazione tra il fumo di sigaretta e il rischio di fibromi uterini che però sono contrastanti. I primi studi hanno suggerito un effetto protettivo del fumo, al contrario, gli studi successivi hanno mostrato un aumento del rischio di mioma, mentre altri non hanno documentato una relazione. Il fumo sembra ridurre i livelli di estrogeni circolanti, ad esempio inibendo l'aromatasi, che è responsabile della conversione degli androgeni in estrone e dello spostamento del metabolismo dell'estradiolo verso le vie di 2-idrossilazione, diminuendo così la biodisponibilità degli estrogeni. Tuttavia, il fumo può anche esercitare effetti correlati agli estrogeni sull'utero, che potrebbero promuovere la proliferazione cellulare.

Oltre al fumo, diversi studi hanno dimostrato associazioni tra il consumo di alcol e un rischio più elevato di fibromi. Il possibile meccanismo esplicativo è l'aumento dei livelli totali di estrogeni e degli estrogeni biodisponibili causati

dall'alcol. Anche il consumo di caffeina può aumentare la produzione di steroidi sessuali, infatti aumenta i livelli di estradiolo in fase follicolare precoce e può aumentare la produzione di steroidi sessuali, inibendo la fosfodiesterasi. Nonostante questa prova biologica, il consumo di caffeina non ha dimostrato di essere un fattore di rischio per i fibromi tra le donne di tutte le età.

### *1.3.3 Carcinogenesi e diagnosi*

I precisi cambiamenti molecolari e cellulari che hanno portato allo sviluppo e alla crescita del leiomioma uterino non sono ancora ben compresi. Tuttavia, come abbiamo visto, una caratteristica distintiva conosciuta del leiomioma uterino è l'eccessivo accumulo di componenti di matrice extracellulare (ECM) tra cui collageni, fibronectina, laminine e proteoglicani (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Presentazione ipotetica della fibrosi nel leiomioma uterino (Islam et al., 2018).

Un certo numero di studi indicano che l'accumulo e la funzione dell'ECM sono regolati da fattori di crescita, citochine e ormoni steroidei. Si è ipotizzato che la formazione del leiomioma uterino sia una conseguenza di una risposta infiammatoria impropria con protagonisti i miofibroblasti che svolgono il ruolo di depositare grande quantità di collagene nel tessuto del leiomioma. Questa risposta infiammatoria può essere dovuta ad eventi come l'ovulazione, le mestruazioni e l'impianto che possono creare lesioni fisiologiche nell'utero ma anche da stimoli dannosi, le forze meccaniche, l'ipossia e lo stress ossidativo che

possono creare uno stato infiammatorio cronico nell'utero. Una volta che è avvenuta la lesione, i miofibroblasti producono ECM per promuovere i successivi processi di riparazione e l'omeostasi. Tuttavia, durante l'infiammazione cronica, i miofibroblasti producono continuamente ed eccessivamente ECM con conseguente fibrosi patologica. Infatti, l'accumulo di matrice è un evento critico nella produzione della struttura rigida del leiomioma, e si pensa che la rigidità dell'ECM sia una causa di sanguinamento anormale e dolore o pressione pelvica (Islam et al., 2018).

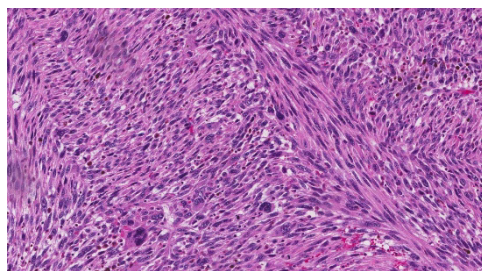
I fibromi vengono facilmente rilevati mediante ultrasuoni o altre tecnologie di imaging, come risonanza magnetica o tomografia assiale computerizzata; tuttavia, l'imaging non indica mutazioni o presentazione dei sintomi, ne distingue tra fibromi e leiomiosarcoma. Infatti, è disponibile un sistema di classificazione standard per descrivere i fibromi uterini in base alla posizione e sistemi di punteggio più dettagliati che incorporano la gravità dei sintomi, le dimensioni e l'eterogeneità delle escrescenze. Piccoli fibromi potrebbero essere rilevati in pazienti asintomatici, ma gli ultrasuoni vengono spesso eseguiti solo dopo che i sintomi del paziente diventano abbastanza gravi da richiedere la consultazione di un medico.

Sebbene sia possibile che le popolazioni a rischio possano essere sottoposte a screening proattivo mediante ultrasuoni per rilevare e trattare i fibromi, prendere

di mira questi gruppi potrebbe anche causare danni inutili attraverso il trattamento eccessivo di pazienti asintomatici. Per ottenere la prevenzione o il trattamento precoce dei pazienti con fibromi sintomatici, sono necessari studi a lungo termine per fornire una migliore comprensione dei marcatori genetici che sono alla base delle differenze tra popolazioni di pazienti asintomatici e sintomatici. (Aninye e Laitner, 2021).

## 1.4 Leiomiosarcomi uterini

Il leiomiosarcoma (LMS) è una forma tumorale aggressiva dei tessuti molli derivata da cellule muscolari lisce. Tale tumore è appartenente ai sarcomi, ovvero tumori maligni derivanti da linee cellulari mesenchimali e di tutti i sarcomi, circa il 5-10% sono leiomiosarcomi (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Immagine istologica del leiomiosarcoma (Wasserman, 2023).

Possono essere di varia origine, ovvero uterina, gastrointestinale o dei tessuti molli ma sarà di nostro interesse approfondire la forma uterina. I leiomiosarcomi uterini sono una forma rara e aggressiva di cancro uterino e nascono dal rivestimento endometriale o dal miometrio dell'utero. Rispetto ai più comuni

carcinomi endometriali, i sarcomi uterini si comportano in modo più aggressivo e sono associati a una prognosi peggiore (Menon et al., 2024).

I sintomi clinici del leiomiosarcoma non sono specifici e non si differenziano significativamente da quelli del leiomioma; infatti, si è notato anche un rapido aumento delle dimensioni quasi allo stesso modo tra le donne con leiomiomi.

Il leiomiosarcoma si diffonde attraverso la diffusione locale, regionale o ematogena. Quest'ultima diffusione avviene preferenzialmente ai polmoni, mentre la diffusione locale e regionale può provocare una massa addominale o pelvica associata a sintomi gastrointestinali o del tratto urinario.

Il tipico leiomiosarcoma si presenta come una massa solitaria di grandi dimensioni, con un diametro medio del tumore di 6 cm, con una consistenza carnosa. La superficie tagliata della massa presenta un aspetto variegato che va dal marrone chiaro al grigio con focolai di emorragia e necrosi, questo sottolinea un aspetto in netto contrasto con la superficie rigonfia, a spirale, da bianco perlacea a grigia, del tipico leiomioma.

Microscopicamente, un leiomiosarcoma tipico è composto da fasci intrecciati di muscolatura liscia con nuclei che appaiono smussati con un unico nucleolo o nucleoli multipli prominenti. I margini del tumore sono prevalentemente ben delineati, ma è spesso presente un'infiltrazione focale nel miometrio circostante.

Diverse caratteristiche sono tipicamente evidenti nei leiomioidarcomi: atipia prominente, abbondante attività mitotica e aree di necrosi delle cellule tumorali. La presenza di due di queste tre caratteristiche microscopiche è fondamentale per una diagnosi di leiomioidarcoma (Moinfar et al., 2007)

#### *1.4.1 Epidemiologia*

Nel 1986, Harlow et al. evidenziarono una più elevata incidenza di leiomioidarcomi nelle donne di razza afroamericana, dimostrando che il rischio di insorgenza di sarcoma uterino nelle donne afroamericane è di tre volte rispetto alle donne caucasiche. I sarcomi rappresentano il 4-9% dei tumori invasivi dell'utero con una incidenza di 1.6-3.3 casi per 100.000 donne all'anno.

I leiomioidarcomi aumentano durante gli anni con un picco di incidenza verso i 52 anni e declinano con l'aumentare dell'età (Harlow et al., 1986).

Solo il 15% dei casi di LMS si verifica tra le donne di età inferiore a 40 anni e uno dei pazienti più giovani aveva solo 28 anni.

In aggiunta, la frequenza di leiomioidarcomi incidentali rilevati tra le donne sottoposte a intervento chirurgico per presunti leiomiomi aumenta direttamente con l'aumentare dell'età: 0,2% tra quelle di 31-40 anni, 0,9% tra quelle di 41-50 anni, 1,4% tra quelle di 51-60 anni età e 1,7% tra quelli di età compresa tra 61 e 81 anni (Moinfar et al., 2007).

#### *1.4.2 Fattori di rischio*

A causa della bassa incidenza di questa malattia, l'eziologia dei sarcomi uterini è stata studiata solo in pochi piccoli studi caso-controllo. Si è visto che l'obesità, l'uso in menopausa di estrogeni senza l'attività antagonista dei progestinici, contraccettivi orali, l'uso di tamoxifene, il menarca precoce, la menopausa tardiva, la policistosi ovarica e nulliparità sono associati ad un aumento dei rischi di sarcoma uterino (Felix AS et al., 2013).

In vista di ciò possiamo suddividere pertanto i fattori di rischio in tre categorie: fattori ambientali, ormonali, eredo familiari.

Tra i fattori ambientali sono presenti l'obesità, l'ipertensione arteriosa e un regime alimentare ricco di grassi animali che sono elementi comuni nell'anamnesi patologica delle pazienti affette da carcinoma dell'endometrio essendo responsabili di un'aumentata produzione di estrogeni a seguito dell'aromatizzazione di androgeni di provenienza surrenalica. Per contro attività fisica, diete ricche di fibre sembrano essere fattori protettivi (La Vecchia et al., 1986).

Oltre ai fattori ambientali, molti studi pubblicati fino ad ora hanno messo in evidenza come la terapia con estrogeni senza l'aggiunta di progestinici, aumenti il rischio di tumore dell'endometrio da 2 a 10 volte. Anche il trattamento con tamoxifene, agonista parziale degli estrogeni, è associato ad una maggior

incidenza di cancro dell'endometrio nelle donne in trattamento ormonale adiuvante per cancro della mammella; pertanto, è necessaria un'attenta valutazione ecografica dell'endometrio sia prima di iniziare il trattamento che durante lo stesso al fine di individuare tempestivamente eventuali modifiche dello spessore endometriale.

Oltre ad una maggiore predisposizione genetica al solo carcinoma endometriale, è possibile una predisposizione familiare a sviluppare tumori maligni in diversi organi (sindrome di Lynch di tipo II: endometrio, mammella, colon ed ovaio) (Assikis et al., 1996).

#### *1.4.3 Stadiazione e diagnosi*

La stadiazione del leiomiomasarcoma uterino segue il sistema di stadiazione della Federazione di Ginecologia e Ostetricia (FIGO). Tale sistema li divide in: tumori dello stadio I se il tumore è confinato al corpo uterino, successivamente suddivisi in tumore IA se limitato all'endometrio, tumore IB se invade fino o meno del 50% del miometrio e il tumore IC se invade più del 50% del miometrio. Il tumore in stadio II se invade la cervice ma non si estende oltre l'utero e suddiviso in IIA se si ha un solo coinvolgimento ghiandolare endocervicale e IIB se invade lo stroma cervicale. Lo stadio III si decreta se il tumore ha diffuso localmente e/o regionalmente, suddivisi in IIIA se il tumore coinvolge la sierosa uterina e/o

l'annesso (estensione diretta o metastasi), IIIB se è presente un coinvolgimento vaginale (estensione diretta o metastasi) e IIIC se sono presenti metastasi ai linfonodi pelvici e/o paraaortici. Un ultimo stadio è lo stadio IV in cui il tumore IVA invade la mucosa della vescica e/o la mucosa intestinale e IVB che presenta metastasi a distanza (Benson e Miah, 2017).

Inoltre, il leiomiosarcoma viene raggruppato per quanto riguarda il grado di differenziazione come segue:

G1: 5 per cento o meno di una crescita solida non squamosa o non morulare;

G2: dal 6 al 50 per cento di una crescita solida non squamosa o non morulare;

G3: più del 50% di una crescita solida non squamosa o non morulare.

Il leiomiosarcoma uterino può essere diagnosticato casualmente dopo un'isterectomia per la diagnosi di leiomiomi uterini. Le differenze istopatologiche che distinguono il leiomiosarcoma dal leiomioma pseudo-sarcomatoso si basano su diversi fattori, come un tasso di mitosi più elevato (per 10 HPF), la presenza di necrosi coagulativa, l'assenza di aree miomatose e recettori di estrogeni e progesterone insieme ad un alto tasso metastatico e di mortalità (Watanabe e Suzuki, 2006). Nelle donne con una chiara diagnosi di leiomiosarcoma uterino localizzato, l'isterectomia è il gold standard, anche se, fino ad oggi, per distinguere tra leiomioma e leiomiosarcoma, vengono considerati solo alcuni criteri istopatologici, tra cui l'attività mitotica, l'atipia nucleare e la necrosi delle cellule

tumoriali. Per definire lo stato clinico completo, possono essere utilizzati diversi altri fattori anamnestici e prognostici, come l'età, la post-menopausa, lo stadio e la dimensione del tumore sanguinante anormale pre-menopausa o post-menopausa ( $> 8$  cm) (George et al., 2018). Tuttavia, ci sono situazioni intermedie che possono indurre in errore, come il leiomioma pseudo-sarcomatoso, che è una variante di leiomioma benigno che condivide alcune caratteristiche con il leiomiosarcoma.

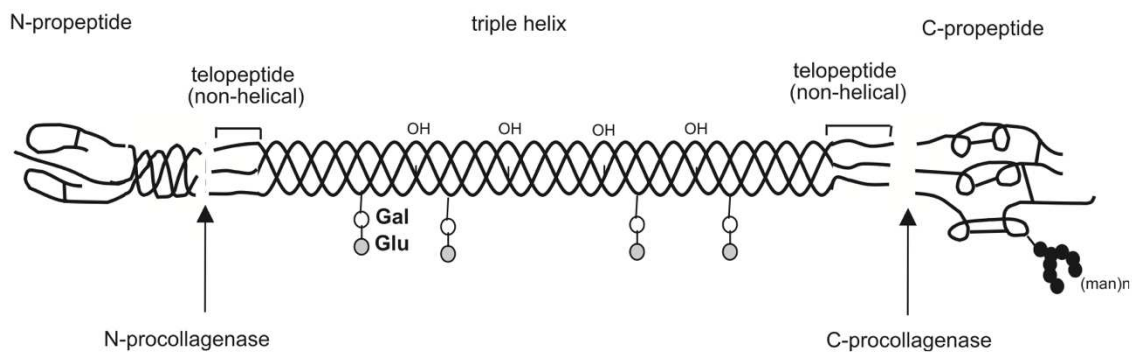
Tipicamente, per confermare la diagnosi si può effettuare l'immunoistochimica che consente al patologo di evidenziare diversi tipi di proteine all'interno delle cellule tumorali. In questo test, le cellule tumorali saranno positive alle proteine normalmente presenti nella muscolatura liscia come actina muscolare liscia (SMA) e desmina (Wasserman, 2023).

## **1.5 Collagene: struttura e funzione**

È noto che il fibroma uterino presenta una maggiore espressione di diversi sottotipi di collagene, in particolare dei tipi I e III, che assumono una struttura e un'organizzazione differenti rispetto al collagene presente nel miometrio sano. Queste variazioni strutturali consentono di classificare i vari istotipi di fibromi, rendendo essenziale uno studio approfondito sulla sua composizione, struttura e biosintesi. Il collagene appartiene alla famiglia delle glicoproteine fibrose,

caratterizzate da una struttura fibrillare che contribuisce alla formazione dell'impalcatura extracellulare. Infatti, è la proteina più abbondante nella matrice extracellulare dei tessuti connettivi e interstiziali di quasi tutti gli organi parenchimali, dove favorisce la stabilità dei tessuti e degli organi, mantenendone l'integrità strutturale (Gelse et al., 2003).

Per permettere l'assemblaggio della tripla elica è essenziale la presenza di un residuo di glicina in ogni terza posizione delle catene polipeptidiche, generando così domini con ripetizioni del tripeptide Gly-X-Y, ricco di prolina, che aiutano a formare triple eliche di collagene. Le posizioni rappresentate da X e Y sono comunemente occupate dalla prolina e dall'idrossiprolina e, a seconda del tipo di collagene, alcuni residui di prolina e idrossiprolina vengono sottoposti a idrossilazione enzimatica dopo la sintesi proteica (Prolino et al., 2002). Osservando la struttura si nota una disposizione che consente un impaccamento compatto intorno all'asse centrale della molecola dovuto alle  $\alpha$ -eliche che si avvolgono attorno a un asse centrale in modo che i residui di glicina si trovino al centro della tripla elica, mentre le catene laterali si dispongono all'esterno in quanto più ingombranti (Figura 1.9).



**Figura 1.9:** Struttura molecolare dei collagene fibrillari con i vari sottodomini e i siti di scissione per N- e C-procollagenasi (Gelse et al., 2003).

Oltre a fornire componenti strutturali per la rete fibrosa della matrice extracellulare, questi membri svolgono anche molte altre funzioni grazie a ulteriori domini proteici (Gelse et al., 2003).

I collagene vengono classificati su base genetica in 26 tipi differenti che possono essere suddivisi in base alla loro struttura e organizzazione supramolecolare in: fibrillari (tipi I, II, III, V e XI), "Fibril-Associated" o FACIT (tipi IX, XII, XIV, XIX, XX e XXI), microfibrillari (tipo VI), fibrille di ancoraggio (tipo VII), collagene a reticolo esagonale (tipi VIII e X), collagene transmembrana (tipi XIII e XVII), collagene della membrana basale (tipo IV), multiplessine (tipi XV, XVI, XVIII), e altri tipi con specifiche funzioni.

Pur nella varietà strutturale che distingue i diversi tipi di collagene, tutti condividono un'identica struttura fondamentale, ovvero una tripla elica destrorsa formata da tre catene  $\alpha$ -elicoidali sinistrorse. Queste catene possono essere di due

tipi: identiche, come accade negli omodimeri dei collagene di tipo II, III, VII, VIII e X, oppure diverse, come negli eterodimeri dei tipi I, IV, V, VI, IX e XI (Van der rest e Garrone, 1991).

La biosintesi dei collagene è un processo articolato da più fasi e avviene a partire dalla trascrizione genica dei geni all'interno del nucleo fino all'aggregazione degli eterotrimeri di collagene in grandi fibrille. Nel dettaglio, la trascrizione è regolata da fattori di crescita e citochine ma dipende dalla tipologia di cellula. La maggior parte dei geni del collagene ha rivelato un modello esone-introne complesso, che va da 3 a 117 esoni, con gli mRNA dei collagene fibrillari codificati da più di 50 esoni. Pertanto, in molti casi, potrebbero essere rilevate diverse specie di mRNA, causate da molteplici siti di inizio della trascrizione, splicing alternativo degli esoni o combinazione di entrambi (Gelse et al., 2003).

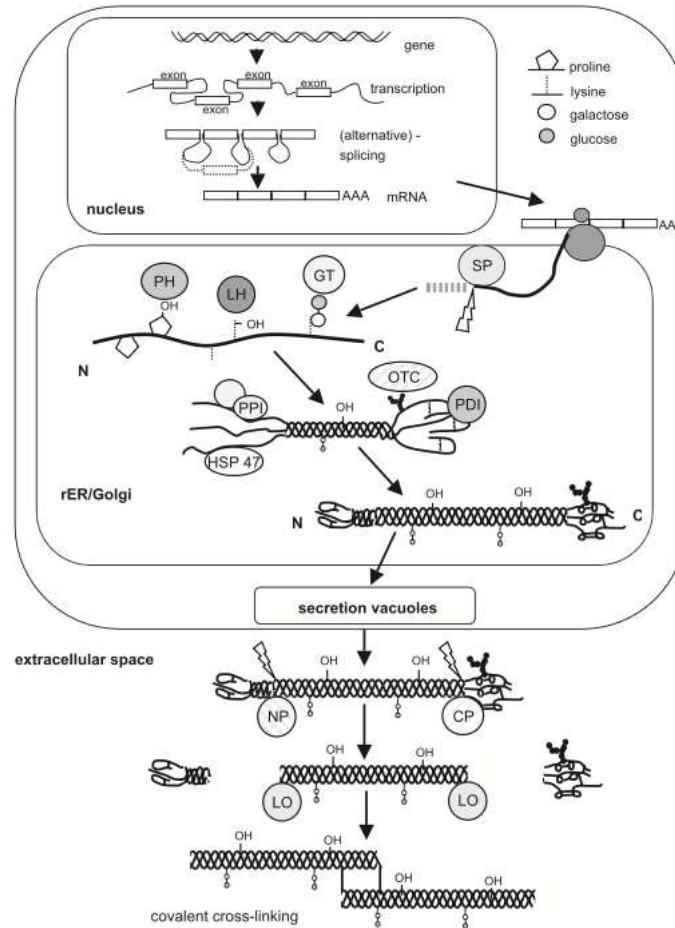
Oltre al processo di splicing, i pre-mRNA vengono sottoposti a modifiche ulteriori, come l'aggiunta di un cappuccio all'estremità 5' (capping) e la poliadenilazione all'estremità 3'. A questo punto l'mRNA è maturo e viene trasportato nel citoplasma, dove è associato al ribosoma e tradotto nel reticolo endoplasmatico ruvido (RER) in molecole di pre-procollagene, che si estendono nel lume del RER grazie a un dominio specifico riconosciuto dai recettori corrispondenti. Una volta rimosso il peptide segnale da una peptidasi, le molecole di procollagene neoformate subiscono diverse modifiche post-traduzionali. A

differenza del collagene maturo, queste molecole conservano due peptidi terminali: uno all'estremità N-terminale e uno all'estremità C-terminale, entrambi con una struttura globulare. I C-propeptidi svolgono un ruolo cruciale nell'assemblaggio delle tre  $\alpha$ -eliche che formano i monomeri trimerici di collagene. La loro struttura globulare è stabilizzata da legami disolfuro intracatenari, mentre un gruppo carboidrato viene aggiunto all'estremità N-terminale dal complesso oligosaccariltransferasi.

Prima della formazione della tripla elica, avviene l'allineamento dei domini C-terminali delle tre  $\alpha$ -eliche, processo che si completa con l'unione degli N-terminali. La formazione e il corretto ripiegamento delle catene di procollagene richiedono l'azione di specifici enzimi, come la peptidil-prolil-cis-trans-isomerasi (PPI), e chaperoni specializzati, tra cui la proteina HSP47.

Al completamento del processamento e assemblaggio del procollagene, le molecole a tripla elica vengono confezionate all'interno di vescicole secretorie in un compartimento del Golgi e successivamente rilasciate nello spazio extracellulare. I trimeri di procollagene subiscono poi un'elaborazione specifica in base al tipo di collagene: le estremità N-terminale e C-terminale vengono rimosse da due proteasi dedicate, rispettivamente la procollagene N-proteinasi e la procollagene C-proteinasi, entrambe appartenenti alla famiglia delle metalloproteinasi dipendenti dallo ione  $Zn^{2+}$ . In questo modo vengono liberate

molecole di tropocollagene a tripla elica che si associano spontaneamente, assumendo una disposizione parallela e sfalsata (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Biosintesi del collagene (Gelse et al., 2003).

Le fibrille di collagene sono in grado di deformarsi in modo reversibile e il riarrangiamento in fibrille è stabilizzato dalla formazione di legami crociati intramolecolari che conferiscono al collagene le proprietà fisiche e meccaniche e contribuiscono alla formazione di un network stabile. Le proprietà meccaniche dei collageni che formano fibrille I, II, III, V e XI dipendono dai legami incrociati covalenti, tra cui legami disolfuro nei collageni III, IV, VI, VII e XVI; la

formazione dell'isopeptide N $\epsilon$ ( $\gamma$ -glutamil)lisina nei collagene I, III, V/XI e VII; i legami incrociati riducibili e maturi prodotti attraverso la via della lisil ossidasi; e i prodotti finali avanzati di glicazione (Ricard-Blum, 2011).

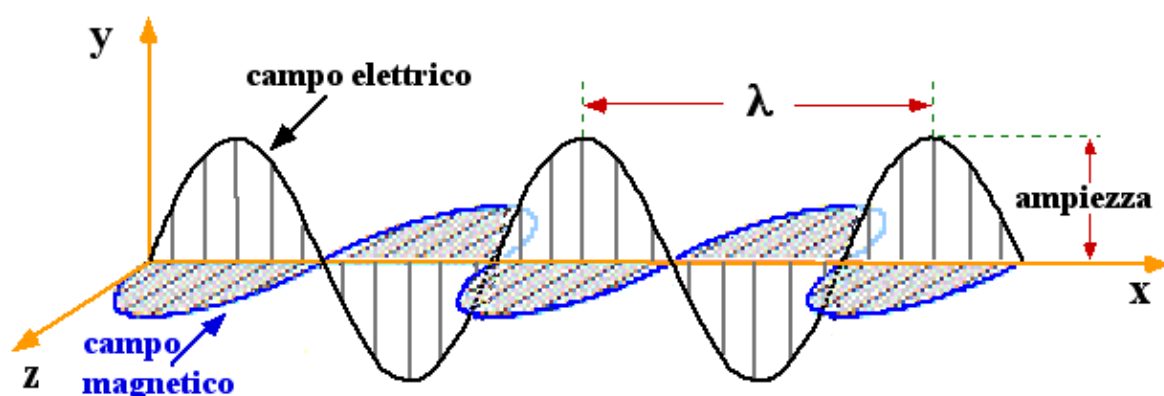
Il collagene svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità strutturale di tessuti e organi, in particolare dei tessuti connettivi e degli organi parenchimali, dove rappresenta la componente principale della matrice interstiziale e delle membrane basali. Oltre a questa funzione strutturale, i collagene partecipano a numerosi altri processi biologici. Specifici recettori, come le integrine, la glicoproteina VI e i recettori dei proteoglicani, mediano l'interazione con il collagene. Questi recettori regolano diversi aspetti cellulari, tra cui adesione, differenziamento, crescita, reattività e sopravvivenza, attraverso meccanismi di segnalazione diversificati. Inoltre, il collagene contribuisce all'intrappolamento, al deposito locale e al trasporto di fattori di crescita e citochine, svolgendo un ruolo essenziale nello sviluppo degli organi, nella guarigione delle ferite e nella riparazione tissutale (Gelse et al., 2003).

## 1.6 La Spettroscopia Infrarossa

Una delle problematiche più importanti in chimica e in biologia è quella di conoscere la struttura delle molecole che si stanno studiando per capire quali sono i legami che le compongono. In passato, la chimica sfruttava delle semplici reazioni chimiche che davano delle evidenze visive ma oggi si utilizzano tecniche di natura fisica, come la spettroscopia infrarossa, che permettono di definire l'esatta struttura e composizione del campione. La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica analitica utilizzata per identificare e studiare la composizione chimica di vari campioni basandosi sull'assorbimento della radiazione infrarossa da parte delle molecole, in particolare con la porzione del medio IR (fra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ), provocando transizioni vibrazionali dei legami chimici. L'assorbimento di determinate frequenze dipende dalla natura dei legami chimici presenti nel campione e questo consente di caratterizzare i gruppi funzionali che compongono la molecola. Il vantaggio di tale tecnica è che permette di avere informazioni di tipo quantitativo e qualitativo a livello strutturale e sulla composizione macromolecolare di diversi tipi di materiali nei diversi stati fisici senza deteriorare il campione. La versatilità e la capacità di mantenimento del campione hanno reso la spettroscopia IR una tecnica fondamentale per analisi biologiche.

### 1.6.1 Principi teorici

Per comprendere il funzionamento della spettroscopia IR è necessario soffermarsi sui principi teorici dell'elettromagnetismo. Come primo punto è bene sottolineare che la radiazione elettromagnetica ha un comportamento dualistico onda/particella e che, per tale ragione, viene trattata sia secondo la teoria ondulatoria sia secondo quella corpuscolare. Dal punto di vista dell'elettromagnetismo classico, la radiazione elettromagnetica viene considerata un fenomeno ondulatorio generato dalla combinazione di un campo elettrico "E" e di un campo magnetico "B" oscillanti che si muovono perpendicolarmente tra loro e alla direzione di propagazione dell'onda (Figura 1.11) (Chiappe et al., 2011).



**Figura 1.11:** Rappresentazione della radiazione elettromagnetica ([https://www.chimica1956.it/generale/luc\\_06.htm](https://www.chimica1956.it/generale/luc_06.htm)).

Pertanto, la radiazione elettromagnetica è un'onda che si propaga alla velocità della luce  $c$  ( $3,00 \times 10^8$  m/s) e può essere descritta mediante ampiezza, lunghezza d'onda e frequenza. L'ampiezza è definita come l'altezza dell'onda rispetto

all'asse di propagazione. È detta lunghezza d'onda ( $\lambda$ , cm) la distanza tra due massimi consecutivi dell'onda, mentre la frequenza ( $\nu$ ) è il numero di volte che la lunghezza d'onda si ripete nell'unità di tempo e viene espressa in  $s^{-1}$  o Hertz. La velocità della luce, la lunghezza d'onda e la frequenza sono messe in relazione dal rapporto seguente:

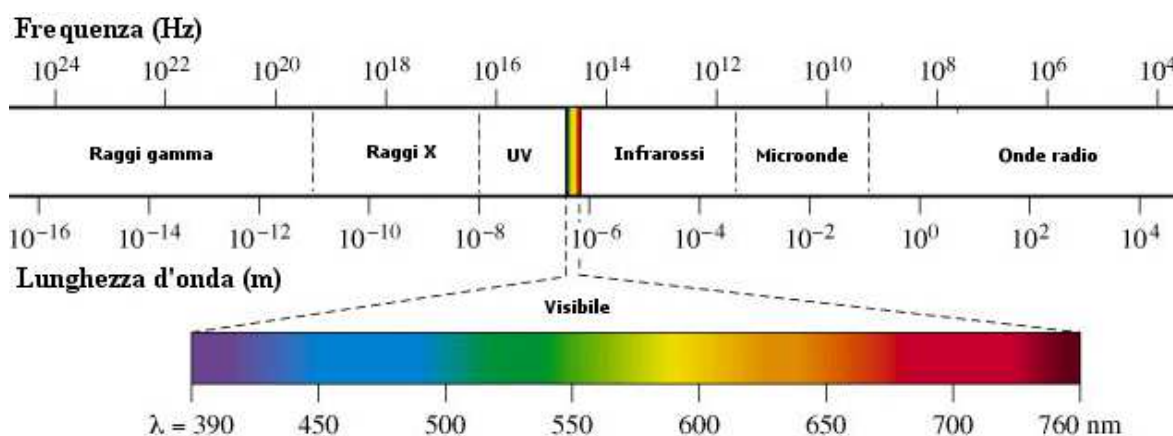
$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

come si può vedere dal tipo di rapporto, tanto più è grande la lunghezza d'onda, tanto più piccola sarà la frequenza.

Nella spettroscopia IR si utilizza, preferenzialmente, il numero d'onda che è il numero di oscillazioni nell'unità di lunghezza e corrisponde al reciproco della lunghezza d'onda (espresso in  $cm^{-1}$ ):

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c}$$

Le radiazioni elettromagnetiche possono differirsi per la lunghezza d'onda e di conseguenza per la frequenza e proprio a seconda dell'intervallo di frequenza le radiazioni assumono nomi diversi e l'insieme di tutte le possibili frequenze dà origine allo spettro elettromagnetico (Figura 1.12).



**Figura 1.12:** Spettro della radiazione elettromagnetica (<https://www.chimica-online.it/download/spettro-del-visibile.htm>).

L'intervallo delle frequenze dell'intero spettro elettromagnetico viene suddiviso in ampie zone, ovvero onde radio, onde TV, microonde, infrarosso, visibile, ultravioletto, raggi X, raggi  $\gamma$  e raggi cosmici. All'interno di tale spettro, le frequenze che compongono la luce e che sono visibili all'occhio umano sono comprese tra 380 e 780 nm.

In riferimento al comportamento dualistico, ricordiamo che la radiazione elettromagnetica si comporta anche da particella e infatti, secondo la teoria corpuscolare, è costituita da fotoni, cioè un fascio di particelle prive di massa che trasportano energia. Ogni fotone trasporta una certa quantità di energia definita come quanto di energia, ovvero la quantità minima di energia che possono scambiare. Questa energia è in relazione alla frequenza della radiazione attraverso l'equazione di Planck:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

(h è la costante di Planck ed è pari a  $6,6261 \times 10^{-34}$  Js).

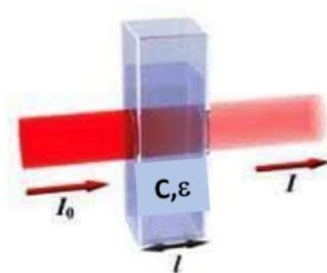
Dall'equazione si può dedurre che l'energia è direttamente proporzionale alla frequenza e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda. Questo comporta che non tutti i fotoni trasportano la stessa energia e che questa dipende dalla frequenza e dalla lunghezza d'onda. Pertanto, se si considera lo spettro elettromagnetico, le radiazioni dotate di lunghezza d'onda maggiore, come l'infrarosso, le onde radio e le microonde, hanno energia minore. Al contrario, le radiazioni dotate di lunghezza d'onda minore sono altamente energiche come nel caso degli ultravioletti, dei raggi  $\gamma$  e raggi X. L'elevata energia di queste radiazioni le rendono capaci di provocare danni biologici in quanto possiedono energia sufficiente per liberare elettroni dagli atomi della materia che viene attraversata. Si può considerare la radiazione elettromagnetica come il mezzo opportuno per trasferire energia alla materia. Quando un fotone dotato di energia interagisce con una molecola, trasferisce l'energia alla molecola stessa e questa energia determina il passaggio dallo stato fondamentale (di energia più bassa) allo stato eccitato (di energia più alta). Questa capacità della materia viene definita assorbimento e può verificarsi solo se il fotone possiede energia pari alla differenza tra i due livelli energetici della molecola. Dato che i livelli energetici sono quantizzati, solo la luce con opportuna energia può essere assorbita e il tipo di eccitazione dipende

dalla lunghezza d'onda della radiazione e dalla natura chimica e fisica del materiale.

Si definisce la spettroscopia FTIR come spettroscopia di assorbimento poiché i legami chimici che si trovano all'interno del campione assorbono determinati numeri d'onda, con conseguenti transizioni vibrazionali la cui analisi permette di studiare i gruppi funzionali e quindi la composizione chimica del campione in esame. Per valutare quantitativamente l'assorbimento si sfrutta la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon C l$$

dove l'assorbanza è in funzione della concentrazione della specie in esame (C), del cammino ottico (l), che è la distanza che il raggio percorre all'interno del campione e del coefficiente di estinzione molare del campione.



**Figura 1.13:** Assorbimento della radiazione elettromagnetica da parte di un campione (<https://farelaboratorio.accademiadelle scienze.it/esperimenti/scienze/54>)

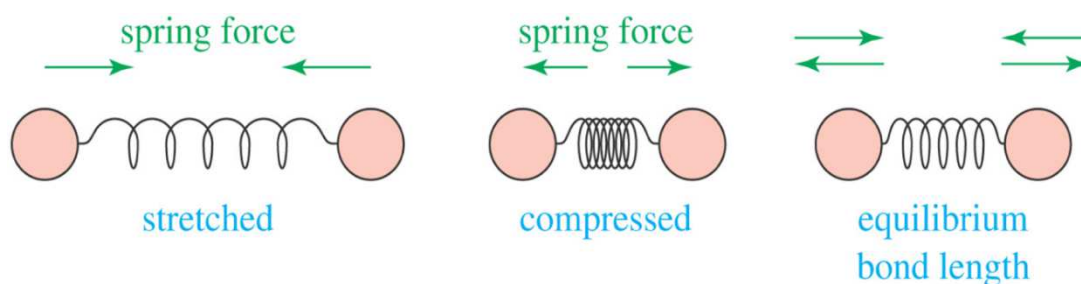
Un'altra grandezza importante e correlata è la trasmittanza:

$$T = I/I_0$$

ovvero il rapporto tra l'intensità di luce trasmessa dal campione (I) e l'intensità della luce incidente ( $I_0$ ), cioè la porzione di luce che attraversa il campione senza essere assorbita.

Nella spettroscopia infrarossa, l'assorbanza descritta è quella che determina le transizioni vibrazionali dei legami della molecola.

Per comprendere meglio le transizioni vibrazionali su cui si basa la spettroscopia FTIR si può osservare il comportamento di una molecola biatomica, in cui gli atomi sono paragonati a masse puntiformi ( $m_1$  e  $m_2$ ) connessi mediante una molla elastica (che rappresenta il legame chimico) soggetta a un solo movimento vibrazionale (detto *stretching* o stiramento) che avviene lungo l'asse di legame e determina l'aumento o la diminuzione del legame stesso (Figura 1.14).



**Figura 1.14:** Rappresentazione del modello della meccanica classica ([http://wwwdisc.chimica.unipd.it/alfonso.zoleo/privata/documentazione/insegnamenti/Lezioni%20Metodologie%20Spettroscopiche%20per%20le%20Biotecnologie/5Lezione\\_2016\\_17.pdf](http://wwwdisc.chimica.unipd.it/alfonso.zoleo/privata/documentazione/insegnamenti/Lezioni%20Metodologie%20Spettroscopiche%20per%20le%20Biotecnologie/5Lezione_2016_17.pdf)).

Pertanto, una molecola biatomica può essere paragonata ad un oscillatore armonico che segue la legge di Hooke:

$$F = -kx$$

in cui  $k$  è la costante di forza della molla (nel caso in esame rappresentata dal legame) e  $x$  che rappresenta lo spostamento.

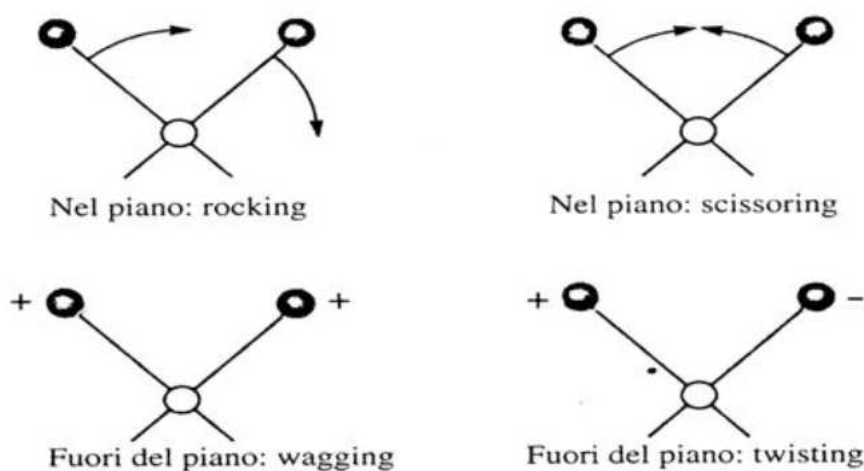
Quando un sistema di questo tipo è allontanato dalla situazione di equilibrio si sviluppa una forza di richiamo che viene indicata dal segno negativo, visto che ha verso opposto alla forza che ha provocato lo spostamento.

L'energia varia esponenzialmente e senza limiti in risposta all'allungamento e all'accorciamento del legame, però fra due atomi esistono diverse forze attrattive e repulsive che originano dal legame chimico. Queste forze influenzano l'energia vibrazionale e si bilanciano ad una distanza ben precisa rappresentata dalla distanza di legame e quando ciò avviene il sistema si trova in un minimo di energia potenziale. Esistono due tipi di vibrazioni possibili che interessano i legami chimici: stretching e bending. Lo stretching, o stiramento, è un movimento ritmico lungo la linea che unisce gli atomi che determina una variazione nella lunghezza del legame, ovvero una riduzione o un aumento della distanza interatomica. Lo stretching può essere simmetrico (con conservazione della simmetria molecolare) o asimmetrico (con perdita di uno o più elementi di simmetria) (Figura 1.15).



**Figura 1.15:** Tipo di vibrazione molecolare: stretching (<https://images.app.goo.gl/chASDzvYwvaK51JW7>).

Il bending, o piegamento, è dovuto alla variazione dell'angolo di legame con un atomo in comune e può avvenire con quattro tipologie diverse denominate *scissoring* e *rocking* (nel piano), *wagging* e *twisting* (fuori dal piano) (Figura 1.16).



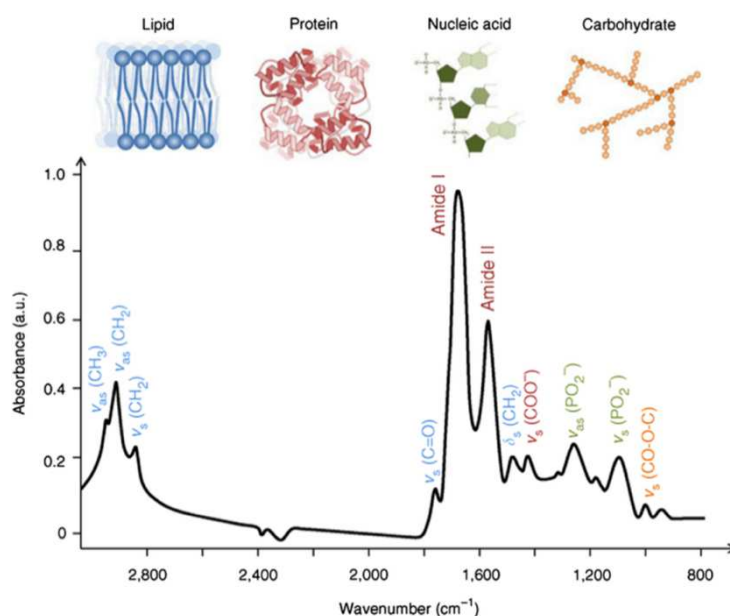
**Figura 1.16:** Tipo di vibrazione molecolare: bending (<https://images.app.goo.gl/chASDzvYwvaK51JW7>).

Non sempre le vibrazioni portano allo sviluppo di bande di assorbimento nello spettro IR. Esistono delle regole di selezione che rappresentano i limiti entro i quali è possibile avere una banda in seguito a interazione tra radiazione e materia.

La prima regola di selezione afferma che la transizione può avvenire solo se l'energia posseduta dalla radiazione è esattamente uguale alla separazione fra due livelli vibrazionali della molecola; la seconda regola di selezione enuncia che l'assorbimento di questa energia deve generare dei cambiamenti nel momento dipolare della molecola.

### 1.6.2 Interpretazione dello spettro IR di sistemi biologici

Nonostante la complessità dei campioni biologici, la spettroscopia FTIR è in grado di fornire informazioni al fine di caratterizzare biochimicamente il campione in esame. Questo è reso possibile dall'analisi delle bande presenti a diversi numeri d'onda che definiscono le biomolecole (Figura 1.17).



**Figura 1.17:** Spettro IR biologico ([https://www.researchgate.net/figure/Typical-FTIR-spectra-of-biomolecules-in-biofluids-at-wavenumber-of-3000-800-cm-1\\_fig1\\_338592227](https://www.researchgate.net/figure/Typical-FTIR-spectra-of-biomolecules-in-biofluids-at-wavenumber-of-3000-800-cm-1_fig1_338592227)).

Partendo dall'analisi di specifici picchi IR è possibile stabilire la presenza di diverse macromolecole all'interno del campione, come lipidi, proteine, acidi nucleici e carboidrati. Nello specifico, i lipidi hanno bande caratteristiche a  $3010\text{ cm}^{-1}$  e  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ . Il picco a  $3010\text{ cm}^{-1}$  corrisponde alle vibrazioni delle catene alchiliche insature ed è dovuto allo stretching del legame  $\text{=CH}$ , mentre nel range  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  sono presenti i picchi a  $2852\text{ cm}^{-1}$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$  dovuti rispettivamente allo stretching simmetrico dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  di catene alchiliche sature e i picchi  $2927\text{ cm}^{-1}$  e  $2956\text{ cm}^{-1}$  attribuibili rispettivamente allo stretching asimmetrico dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

Oltre a tali bande è presente un'ulteriore banda a  $1740\text{ cm}^{-1}$  generata dallo stretching del legame  $\text{C=O}$  estereo di acidi grassi e trigliceridi e bande a  $1450\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  dovute al bending dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  dei lipidi.

L'analisi delle proteine mediante spettroscopia IR si basa sulla presenza di bande associate alla vibrazione del legame peptidico, denominate Ammide I, Ammide II e Ammide III. L'Ammide I (ca.  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) è dovuta dallo stretching del legame  $\text{C-N}$  (per l'80%) e di  $\text{C=O}$  (per il 10%) e dal bending del legame  $\text{N-H}$  mentre l'ammide II (ca.  $1540\text{ cm}^{-1}$ ) è dovuta al bending del legame  $\text{N-H}$  e dallo stretching del legame  $\text{C-N}$ . Queste due bande sono definite convolute, ovvero sono formate da bande sottocomponenti che possono essere elaborate tramite specifici software

di peak fitting per ricavarne le sottobande attribuibili alle strutture  $\beta$  turn,  $\beta$  sheets,  $\alpha$  elica, 3-turn e random coil.

Infine, la banda Ammide III è costituita da picchi fra  $1350\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  ed è utile per caratterizzare la presenza di collagene.

Continuando l'analisi dello spettro IR, i picchi a  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $1240\text{ cm}^{-1}$  corrispondono rispettivamente allo stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi fosfato ( $\text{PO}_2^-$ ) caratteristici degli acidi nucleici e di composti fosforilati.

A  $1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1050\text{ cm}^{-1}$  i picchi indicano la presenza dei carboidrati e sono generati rispettivamente dallo stretching e bending del legame C-OH e dallo stretching del legame C-OH.

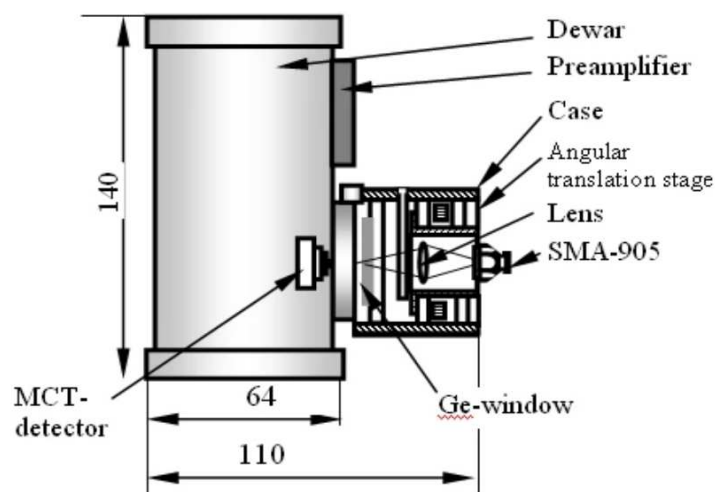
Come ultima analisi, lo spettro IR consente di caratterizzare anche gli acidi nucleici che assorbono a diverse frequenze con picchi a  $1000\text{ cm}^{-1}$  per l'RNA,  $965\text{ cm}^{-1}$  per il B-DNA e  $927\text{ cm}^{-1}$  per Z-DNA.

### *1.6.3 Spettro IR di campioni biologici e analisi FTIR Imaging*

Lo spettrometro FTIR, accoppiato ad un microscopio, permette di effettuare misure infrarosso su varie tipologie di campioni; ciò è possibile grazie al fatto che il microscopio consente di visualizzare la zona da analizzare. Inoltre, l'aggiunta di detector di tipo bidimensionale consente di mappare spettroscopicamente aree specifiche di campioni biologici non omogenei agendo, allo stesso tempo, sullo

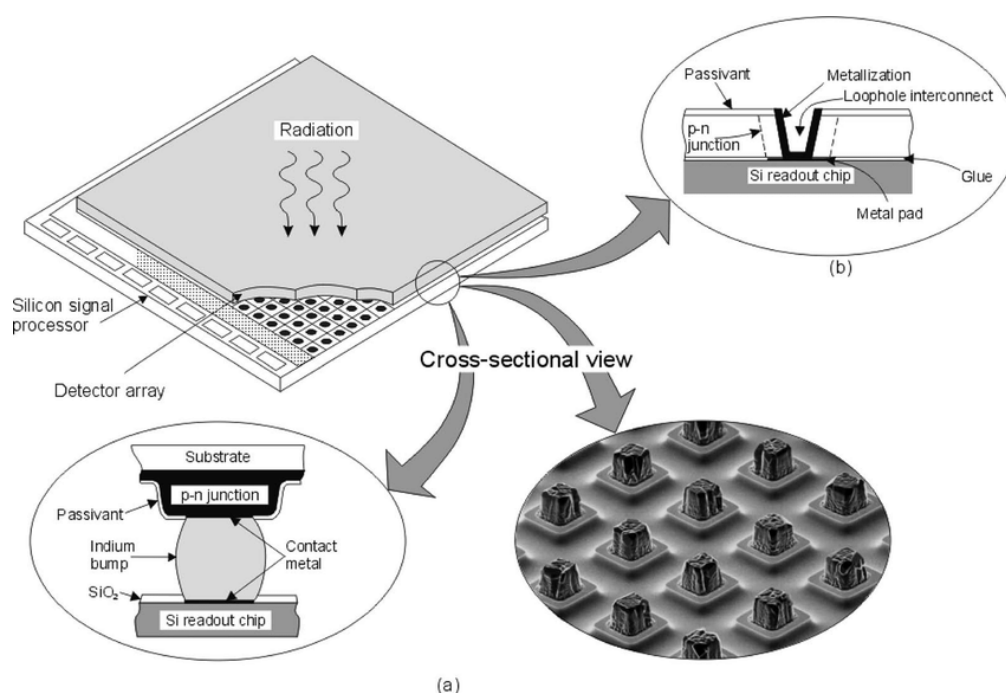
stesso campione per ricavare informazioni biochimiche e ultrastrutturali. Tali detector sono MCT e FPA:

MCT (Mercury-Cadmium-Telluride) è un detector single point che permette di acquisire uno spettro in una regione del campione individuata con il microscopio raggiungendo una risoluzione spaziale di ca. 20  $\mu\text{m}$  se la sorgente è convenzionale e ca. 10  $\mu\text{m}$  se la sorgente non è convenzionale. Per tale motivo, l'MCT viene utilizzato per acquisire cellule, perché con il microscopio siamo in grado di individuare gruppi di tre/quattro cellule abbastanza distinte ed acquisirne lo spettro relativo. Nel caso in cui utilizzassimo la luce di sincrotrone saremmo in grado di acquisire lo spettro di una singola cellula. Il raffreddamento avviene mediante l'utilizzo di azoto liquido e la temperatura alla quale opera è di circa 77 K (Figura 1.18).



**Figura 1.18:** Schema di funzionamento del detector MCT  
(<https://www.findlight.net/fiber-optics/fiber-optomechanics/fiber-couplers/refocusing-coupler-for-dewar-mct-detector>).

L'FPA (Focal Plane Array) è un detector multipoint che permette di acquisire contemporaneamente 4096 spettri su una regione di spazio di  $164 \times 164 \mu\text{m}^2$  con che l'operatore fissa attraverso il microscopio abbinato a monte dello strumento, con una risoluzione di  $2,56 \mu\text{m}$ . Anche esso è raffreddato ad azoto liquido e opera ad una temperatura di 77 K (Figura 1.19).



**Figura 1.19:** Schema di funzionamento del detector FPA

([https://www.researchgate.net/figure/Hybrid-IR-FPA-with-independently-optimized-signal-detection-and-readout-a-indium-bump\\_fig20\\_259659809](https://www.researchgate.net/figure/Hybrid-IR-FPA-with-independently-optimized-signal-detection-and-readout-a-indium-bump_fig20_259659809)).

I dati ottenuti da questo tipo di analisi devono essere sottoposti a specifiche indagini statistiche, ovvero: PCA, Principal Component Analysis; HCA, Hierarchical Cluster Analysis; PLSR, Partial Least Squares Regression e PLA-DA, Discriminant Analysis.

Le caratteristiche e la versatilità della tecnica FTIR la rendono utilizzabile per diversi scopi in ambito biologico, diagnostico e di ricerca. In particolare, la spettroscopia FTIR, grazie alla creazione di immagini iperspettrali in regioni con lesioni tumorali o altre patologie, può fornire importanti informazioni su modificazioni biochimiche consentendo, ad esempio, l'identificazione di marker spettrali di specifiche patologie e lesioni sia benigne che maligne. Inoltre, la capacità di distinguere, grazie alla specificità, sensibilità e accuratezza, fra tessuti sani e patologici, rende questa tecnica un nuovo approccio diagnostico prospettico per varie patologie (Notarstefano et al., 2019).

Sono stati già condotti numerosi studi in cui si sfrutta la capacità della spettroscopia FTIR; in particolare, il gruppo di ricerca presso il quale sto svolgendo la mia tesi ha pubblicato diversi studi inerenti all'analisi FTIR di tessuti normali, precancerosi e cancerosi del cavo orale e dell'utero.

Uno studio tra quelli sopracitati è stato effettuato da Togni et al. su campioni di biopsia con diagnosi istologica di OTSCC in diversi stadi di malignità, nello specifico dallo stadio I al IV. Nel presente studio hanno applicato un approccio multidisciplinare basato sulla spettroscopia PhC-microCT e FTIR che si è rivelato altamente efficace per studiare l'organizzazione del collagene in condizioni patologiche. Hanno effettuato l'analisi statistica confrontando le aree extra tumorali con le aree peri e intra tumorali evidenziando la presenza di un collagene

immaturo nell'area intra tumorale e una maggiore quantità di fasci attribuibili al collagene maturo nell'area extra tumorale. Inoltre, con l'analisi di correlazione tra indici microstrutturali, parametri macromolecolari e stadio clinico nell'area peritumorale hanno evidenziato che esiste una forte correlazione diretta tra lo spessore del fascio di collagene e il rapporto con le proteine totali e che non è presente alcuna correlazione rilevante tra lo stadio clinico e i parametri del fascio di collagene microarchitetturico. Nonostante ciò, questi dati non hanno rilevato alcuna differenza significativa tra gli stadi patologici nell'organizzazione microarchitetturale del fascio di collagene. Al contrario, l'analisi FTIR ha mostrato, a un livello di scala più fine, ovvero a livello macromolecolare, la presenza di collagene che diminuisce progressivamente con la progressione delle fasi cliniche dimostrando che un'analisi FTIR potrebbe fornire un contributo significativo alla comprensione del riarrangiamento del microambiente tumorale (Togni et al., 2024).

Belloni et al. hanno approfondito lo studio del leiomioma uterino con lo scopo di correlare la composizione macromolecolare e la sovraespressione del collagene con la modificazione patologica dell'ECM del leiomioma uterino. In aggiunta, sono stati studiati anche gli effetti degli acidi grassi omega-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA) nella riduzione del collagene. In particolare, la sensibilità e la risoluzione spaziale di tutte queste tecniche hanno fornito

informazioni rilevanti sia sull'organizzazione tridimensionale che sulla struttura secondaria del collagene, evidenziando anche piccole differenze tra tessuti sani e patologici, anche in relazione ai trattamenti con molecole mirate come EPA e DHA. Pertanto, in questo studio hanno dimostrato che la reticolazione di strumenti analitici ad alta risoluzione, in grado di indagare sia l'organizzazione tridimensionale che la struttura secondaria del collagene nelle malattie fibrotiche, potrebbe essere utile per identificare marcatori definiti che correlano lo stato di questa proteina con specifiche condizioni patologiche (Belloni et al., 2022).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il leiomioma uterino è il tumore benigno più comune del tratto genitale femminile. Le statistiche affermano che viene rilevato nell'80% delle donne di origine africana e quasi nel 70% delle donne bianche di età superiore ai 50 anni, ma la sua diffusione è sicuramente sottovalutata in quanto gli studi epidemiologici sono concentrati solo sulle donne sintomatiche. Attualmente la diagnosi di leiomioma uterino avviene mediante tecniche di imaging come la risonanza magnetica o l'analisi ecografica, a cui però si ricorre solo dopo che i sintomi diventano abbastanza gravi da richiedere la consultazione di un medico. A complicare il quadro, si deve sottolineare che i leiomiomi presentano diversi istotipi con caratteristiche non sempre ben definite, e in alcuni casi addirittura simili a quelle presenti nelle lesioni maligne. Tutto ciò può portare in alcuni casi ad una diagnosi differenziale complessa. Fra gli istotipi più diffusi ci sono sicuramente lo *Usuale* e il *Cellulare*: si ipotizza che siano lo stesso istotipo con il *Cellulare* come primo stadio dello *Usuale*. Al contrario, i leiomiomi con istotipo *Bizzarro* e *Apoplettico* sono molto più rari, ma, soprattutto nel caso del *Bizzarro*, la presenza al suo interno di cellule molto simili a quelle del leiomiosarcoma, può portare ad un'errata diagnosi e per questo motivo il Bizzarro viene spesso classificato come STUMP, cioè lesione ad incerto grado di malignità.

Recenti studi hanno dimostrato che informazioni utili possono venire dallo studio della matrice extracellulare, che può essere caratterizzata da modificazioni macromolecolari specifiche per le diverse lesioni.

Una tecnica analitica che consente di fornire caratteristiche morfo-chimiche di campioni di tessuto è la Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier; infatti, mediante tale tecnica si possono identificare le principali macromolecole ed evidenziare possibili alterazioni nella struttura e nella composizione dei campioni analizzati.

Alla luce di tali evidenze, durante il mio lavoro di tesi mi sono occupata dello studio di campioni biotici di leiomioma e leiomioma con diversi istotipi (*Usuale, Cellulare, Bizzarro, Apoplettico*). L'approccio utilizzato è stato di tipo multidisciplinare, basato sulla combinazione della spettroscopia FTIR Imaging con l'istologia e l'analisi statistica (multivariata e univariata).

(1) Lo scopo principale è stato la caratterizzazione morfo-chimica della matrice extracellulare, con particolare attenzione al collagene, e della componente cellulare delle diverse lesioni benigne e maligne, per l'identificazione di marker spettrali, utili per una corretta e più certa diagnosi differenziale.

(2) Inoltre, nell'ultimo periodo, mi sono occupata anche della caratterizzazione morfo-chimica della matrice extra cellulare, e quindi del collagene, nelle

regioni intra, peri ed extra tumorali nel leiomioma con istotipo *Cellulare*.

Questo studio, che è tutt'ora in corso, prevede una analisi simile per quanto riguarda il leiomioma *Usuale*, al fine di verificare l'ipotesi di una loro possibile correlazione.

### 3. PARTE SPERIMENTALE

Il lavoro sperimentale di tesi è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Raccolta e preparazione dei campioni
2. Analisi istologica
3. Acquisizione delle immagini IR
4. Analisi delle immagini IR

#### 3.1 Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni biotici (in totale N. 15) provengono dagli archivi dell'Anatomia Patologica degli Ospedali riuniti di Ancona. Il presente studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico della Regione Marche. La scelta dei campioni è stata effettuata sulla base dei seguenti criteri di inclusione ed esclusione:

- *criteri di inclusione:* (a) età compresa tra 40 e 46 anni e (b) assenza di infezioni del tratto genitale
- *criteri di esclusione:* (a) pazienti che hanno ricevuto una terapia medica o contraccettivi orali nei tre mesi precedenti e (b) pazienti con endometriosi o malattia ovarica.

I campioni chirurgici sono stati suddivisi in base alla tipologia tumorale come segue: N. 10 campioni di leiomioma di cui N. 3 istotipo *Usual*, N. 3 istotipo

*Cellular*, N. 1 istotipo *Apoplectic*, e N. 3 istotipo *Bizzarre*; N. 5 campioni di leiomiosarcoma (Tabella 3.1).

| <b>Tabella 3.1.</b> Lista dei campioni biotici usati nello studio. |                   |                     |             |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------|
| Tipologia                                                          | Istotipo          | Gruppo sperimentale | N. campioni |
| Leiomiosarcoma                                                     | -                 | LMS                 | 5           |
| Leiomioma                                                          | <i>Cellular</i>   | CL                  | 3           |
|                                                                    | <i>Usual</i>      | US                  | 3           |
|                                                                    | <i>Bizzarre</i>   | BZ                  | 3           |
|                                                                    | <i>Apoplectic</i> | AP                  | 1           |

Tutti i campioni sono stati prima di tutto fissati in formalina e inclusi in paraffina (PFFE). Da ogni blocchetto sono state tagliate tramite l'uso di un micrometro, N. 3 sezioni seriali di  $\sim 4 \mu\text{m}$ , di cui due per l'analisi istologica (colorate con H&E e Masson Tricromica) e una non colorata per l'analisi FTIR Imaging.

### 3.2 Analisi istologica

La colorazione dei campioni è stata eseguita presso il laboratorio di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia), in collaborazione con la Dr.ssa Stefania Greco e la Prof.ssa Pasquapina Ciarmela. Sono state usate due diverse colorazioni, la colorazione ematossilina/eosina e la colorazione Masson Tricromica. La colorazione ematossilina/eosina (H&E) è definita bicromica dato che prevede la combinazione dei due coloranti più comuni in campo istologico. L'ematossilina è un colorante basico che colora in blu/viola le componenti cariche negativamente come acidi nucleici che si trovano nel

nucleo, di contro, l'eosina è un colorante acido che colora in rosso/rosa le componenti cariche positivamente come le proteine del citoplasma.

Per effettuare la colorazione H&E si devono effettuare i seguenti passaggi:

- sparaffinatura in xilene, in modo da eliminare la paraffina presente nel tessuto;
- idratazione, con una scala decrescente di alcoli (da etanolo al 100% ad etanolo al 50% e infine passaggio rapido in H<sub>2</sub>O);
- colorazione istologica, con immersione dei vetrini in ematossilina per 13 minuti, lavaggi con H<sub>2</sub>O, e immersione dei vetrini in una vaschetta istologica contenente eosina (1%) e tre gocce di acido acetico glaciale, per 30 secondi e 1 minuto;
- disidratazione, con una scala crescente di alcoli (30 minuti nel 50% di etanolo, 30 minuti nel 70% di etanolo, 1 ora nel 96% di etanolo, 1 ora nel 100% di etanolo);
- 1 ora nello xilene e applicazione del vetrino coprioggetto.

La colorazione Masson Tricromica è particolarmente indicata per riconoscere i vari componenti del connettivo; prevede la combinazione di più coloranti e permette una colorazione sequenziale che consente di identificare il muscolo (colorazione rossa), le fibre di collagene (colorazione verde), gli eritrociti

(colorazione gialla) e i nuclei (colorazione nera). Per questa colorazione è stato utilizzato il kit MASSON TRICHROME GOLDNER.

Per valutare le caratteristiche morfologiche dei campioni (H&E) e la quantità e distribuzione di collagene presente nelle regioni analizzate (Masson Tricomica) si è effettuata l'osservazione tramite microscopio ottico Olympus BM50 (Olympus, Japan), con un ingrandimento 20x al fine di acquisire le panoramiche di tutte le sezioni.

### **3.3 Acquisizione delle immagini IR**

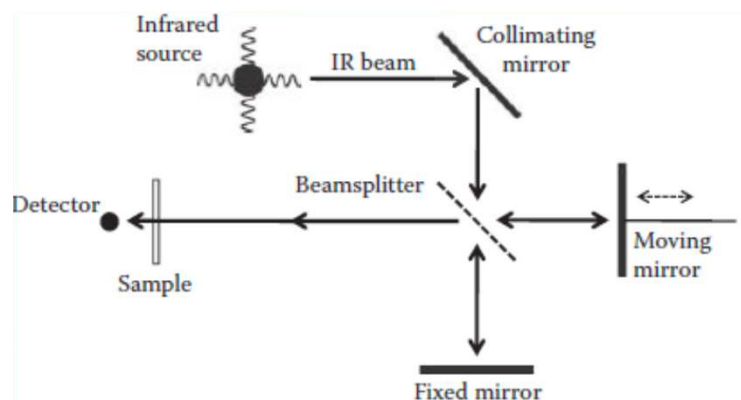
#### *3.3.1 Strumentazione e spettro IR*

Si distinguono due tipologie di spettrometri IR; a dispersione, che sono stati utilizzati fino a pochi anni fa e a Trasformata di Fourier che è la tipologia attualmente in uso e per tale motivo, sarà di nostro interesse. Uno spettrometro IR a Trasformata di Fourier (FTIR) è il prodotto dell'accoppiamento dell'interferometro di Michelson e la trasformata di Fourier. Il cuore pulsante dello strumento è l'interferometro, ovvero un sistema di specchi fissi e mobili che dividono la radiazione in due raggi, uno a distanza fissa e uno a distanza variabile. Nel momento in cui una sorgente di radiazione infrarossa emette un raggio IR, questo va a colpire uno specchio collimatore, il quale allinea tutta la radiazione che è arrivata dalla sorgente e la manda ad un *beam splitter* mobile. A seconda di

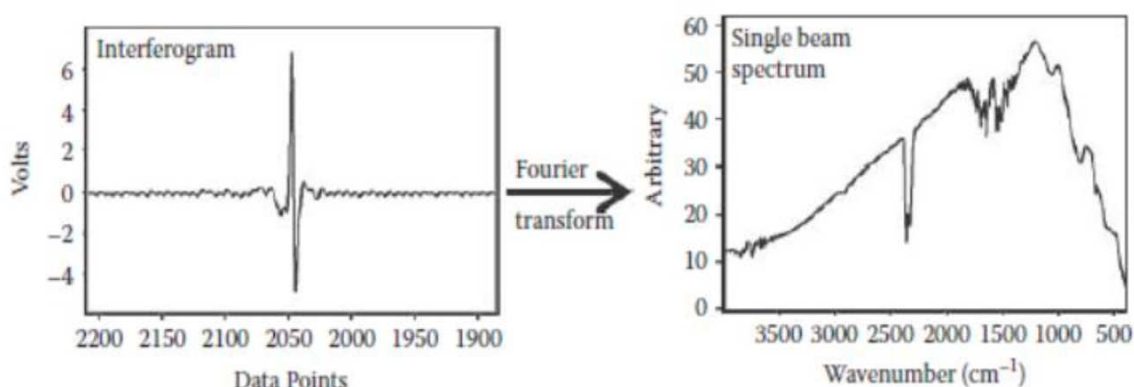
come è posizionato il beam splitter, la radiazione viene divisa in due parti: una parte va allo specchio fisso e una parte va allo specchio mobile.

La radiazione che va allo specchio fisso torna indietro in modo uguale perché essendo fisso non subisce deformazioni, mentre la radiazione che va allo specchio mobile, torna indietro modificata e si ricombina con quella proveniente dallo specchio fisso. Tale movimento continuo genera un'interferenza e una volta che arriva al campione, esso assorbe determinate frequenze. La radiazione fuoriesce dal campione e viene rilevata da un detector che restituisce un interferogramma contenente un segnale nel dominio dei tempi. Quest'ultimo, tramite il modello matematico della Trasformata di Fourier viene convertito nello spettro nel dominio delle frequenze (spettro di assorbimento IR) (Figura 3.1).

(A)



(B)



**Figura 3.1:** (a) interferometro di Michelson; (b) interferogramma e spettro IR  
([https://www.researchgate.net/figure/Fourier-transform-of-interferogram-to-produce-a-single-beam-spectrum-18\\_fig8\\_327779563](https://www.researchgate.net/figure/Fourier-transform-of-interferogram-to-produce-a-single-beam-spectrum-18_fig8_327779563))

Lo spettro IR appare come un diagramma che riporta l'assorbanza ( $A$ ) o la trasmittanza nell'asse delle ordinate e il numero d'onda nell'asse delle ascisse. La trasmittanza viene tendenzialmente riportata in percentuale: corrisponde a 100 quando il campione non assorbe e a 0 quando assorbe totalmente la radiazione incidente.

L'assorbanza ha il vantaggio di essere una funzione lineare della sostanza che assorbe la radiazione e del cammino che il raggio percorre all'interno del

campione. L'insieme di tutte le frequenze assorbite dal campione rappresenta lo spettro infrarosso della sostanza stessa. Lo spettro può essere diviso in tre zone:

- La zona delle alte frequenze che è la regione dei gruppi funzionali, tra 4000 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ .
- La zona delle medie frequenze, tra 1300 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , denominata regione delle impronte digitali perché in questa zona sono presenti le bande originate dalle vibrazioni tipiche del composto in esame.
- La zona delle basse frequenze, tra 900 e 600  $\text{cm}^{-1}$  detta regione dei bending dei legami C-H fuori dal piano.

Le bande di assorbimento IR sono caratterizzate da diversi parametri, tra i quali la posizione, l'intensità e la forma. La posizione viene indicata con il suo numero d'onda e dipende dalla costante di forza del legame di interesse. L'intensità che esprime la probabilità che avvenga la transizione energetica dallo stato fondamentale a quello eccitato che provoca l'assorbimento e corrisponde all'altezza del picco. Infine, la forma che può essere stretta o larga e può essere influenzata dalla unità scelta per la registrazione.

La spettroscopia FTIR, si può definire una tecnica rapida e sensibile dato che il tempo di analisi è notevolmente ridotto, un miglior rapporto segnale/rumore e una elevata precisione dei numeri d'onda.

### *3.3.2 Acquisizione delle immagini IR*

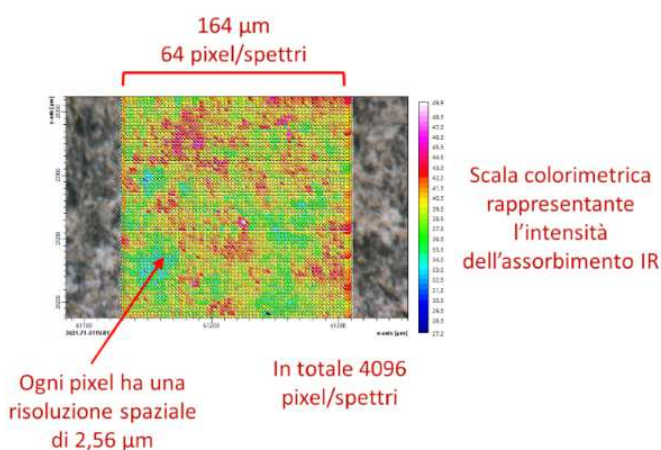
Le sezioni di  $\sim 4 \mu\text{m}$ , ottenute come descritto nel Paragrafo 3.1, sono state depositate su un supporto ottico in Fluoruro di Calcio ( $\text{CaF}_2$ ) dello spessore di 1 mm e diametro di 13 mm, trasparente alla radiazione infrarossa.

L'analisi FTIR Imaging è stata eseguita presso il Laboratorio ARI (Advanced Research Instrumentation Laboratory) del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia). È stato utilizzato uno spettrometro FTIR dotato di interferometro INVENIO-R, accoppiato ad un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR ed equipaggiato con un detector Focal Plane Array (FPA) (Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Tale detector, che opera a 77 K, temperatura mantenuta dall'azoto liquido, permette di acquisire l'immagine VIS-IR di un'area di  $164 \times 164 \mu\text{m}^2$  composta da 4096 pixel/spettri con risoluzione spaziale di  $2.56 \mu\text{m}$ . L'intensità dell'assorbimento della radiazione infrarossa nei vari punti del campione, permette di ricostruire l'immagine IR utilizzando una scala colorimetrica dal blu, che indica le zone con bassi valori di assorbanza, al rosa/bianco, che indicano le aree con alti valori di assorbanza (Figura 3.2).

(A)

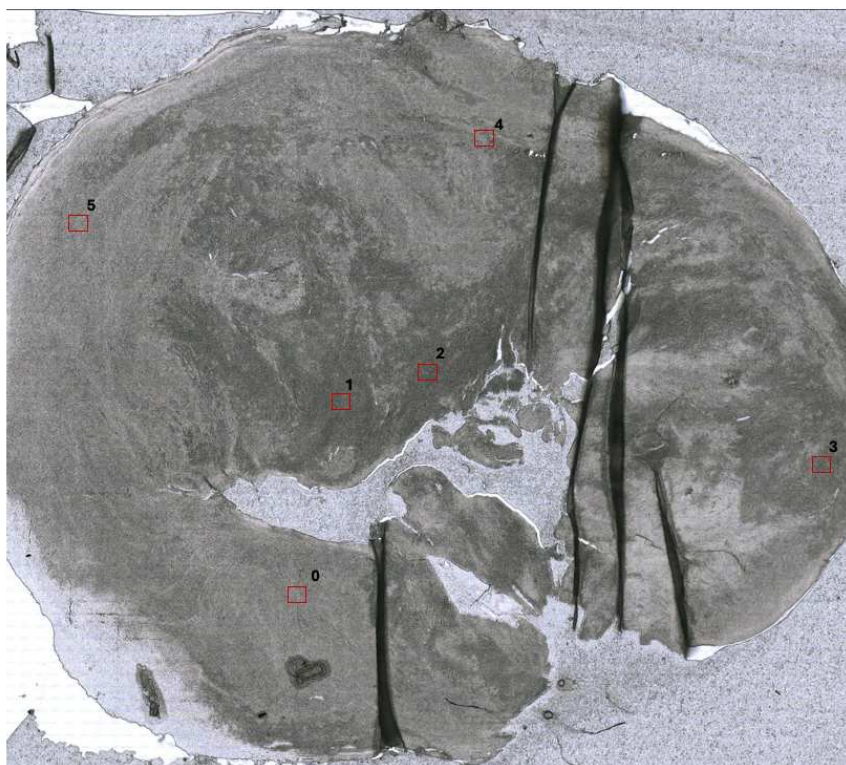


(B)



**Figura 3.2:** (A) Spettrometro FTIR con interferometro INVENIO-R accoppiato ad un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR ed equipaggiato con un detector FPA; (B) Esempio di immagini IR acquisita con il detector FPA.

Sono state dapprima acquisite le immagini panoramiche di tutte le sezioni utilizzando il microscopio ottico (obiettivo 15x). Dall'analisi visiva di queste panoramiche e grazie alle immagini istologiche, ottenute come descritto nel Paragrafo 3.2, è stato possibile individuare le regioni del campione di maggior interesse, sui cui effettuare l'analisi Imaging FTIR. Un esempio della procedura seguita è riportato in Figura 3.3.



**Figura 3.3:** Panoramica di una sezione non colorata di leiomioma per l'analisi FTIR Imaging in cui i quadrati rossi indicano le aree su cui sono state acquisite le immagini IR.

Le immagini IR sono state acquisite in trasmissione nella regione del medio-infrarosso ( $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ) con una risoluzione spettrale di  $4 \text{ cm}^{-1}$  e ogni pixel/spettro è la media di 256 scansioni. Per evitare contributi spettrali dovuti all'ambiente esterno, prima dell'acquisizione di ogni immagine IR si è acquisito, con lo stesso settaggio, lo spettro del background posizionandosi su una porzione pulita del supporto ottico  $\text{CaF}_2$ .

Le immagini IR così ottenute sono considerate “grezze” e per questo sono state processate mediante le procedure di compensazione atmosferica (*Atmospheric Compensation* routine, OPUS 7.5 Bruker Optics) così da eliminare il contributo di anidride carbonica e vapore acqueo; normalizzazione vettoriale (*Vector*

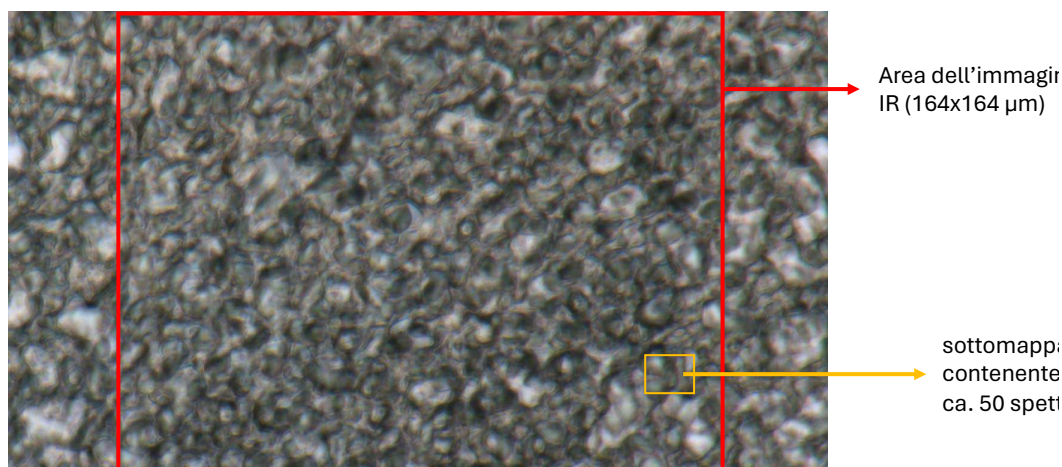
*Normalization* routine, OPUS 7.5 Bruker Optics) per evitare artefatti dovuti alle differenze nello spessore della sezione; interpolazione dello spettro in due intervalli, ovvero 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$  e 1360-900  $\text{cm}^{-1}$  (*Cut* routine, OPUS 7.5 Bruker Optics) e correzione della linea di base (*Baseline correction* routine, two-points , OPUS 7.5 Bruker Optics).

### **3.4 Analisi delle immagini IR**

Le immagini IR pre-processate sono state integrate nelle regioni spettrali 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$  (bande Ammide I e Ammide II relative alle proteine; PROTEINS) e 1299-1184  $\text{cm}^{-1}$  (bande Ammide III rappresentative dei modi vibrazionali del collagene, COLLAGEN), per evidenziare la distribuzione e la quantità relativa di proteine e collagene. A tale proposito, sono state generate delle immagini a falsi colori, in cui il colore blu indica zone con bassi valori di assorbanza, mentre rosa/bianco aree con alti valori di assorbanza.

Successivamente, le immagini IR pre-processate sono state sottoposte ad analisi multivariata. La Hierarchical Cluster Analysis (HCA) ci ha permesso di individuare all'interno delle mappe IR, i cluster spettrali relativi sia alle regioni con maggiore contenuto di collagene che alle aree maggiormente cellulate. A tale riguardo è stato utilizzato il software CytoSpec v. 2.00.01, applicando l'algoritmo di Ward e la distanza Euclidiana.

Per ciascuna lesione sono state scelte N. 5 immagini IR, da cui sono stati estratti ca. 50 spettri dai cluster relativo alle regioni più ricche di collagene e ca. 50 spettri dalle aree maggiormente cellulate. Operativamente, è stato selezionato un rettangolo in ogni immagine IR, da cui è stata estratta una sottomappa (procedura: *Add selection rectangle* → *Extract data* → *Extract mapping subset*; OPUS 7.5 software package Bruker Optics) (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Schema di estrazione della sottomappa dall'immagine IR.

Gli spettri così estratti sono stati sottoposti a Principal Component Analysis (PCA), negli intervalli  $1360\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  e  $1750\text{-}1485\text{ cm}^{-1}$ , utilizzando il software Origin Pro 2023. La PCA, anche nota come trasformata di Karhunen-Loève, è una analisi utilizzata nell'ambito della statistica multivariata per la semplificazione dei dati. L'analisi consente l'identificazione e la differenziazione dei diversi gruppi spettrali, fornendo una rappresentazione grafica (scores plot) degli spettri in gruppi di dati che possiedono una variabilità simile.

Gli spettri relativi al collagene sono stati quindi integrati (procedura: *Integration* → *Setup method* → *Integrate*; OPUS 7.5 software package Bruker Optics) nelle seguenti regioni spettrali: 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$  (rappresentativa delle proteine totali, PRT); 1360-1330  $\text{cm}^{-1}$  (rappresentativa della prolina, PRO) e 1299-1184  $\text{cm}^{-1}$  (rappresentativa del collagene, COLL). I valori ottenuti delle aree integrate sono stati utilizzati per ricavare i rapporti di area delle bande COLL/PRT e PRO/PRT, indicativi rispettivamente del contenuto relativo di collagene e di prolina rispetto al contenuto di proteine.

Per uno studio più approfondito delle due regioni IR 1780-1480  $\text{cm}^{-1}$  e 1360-900  $\text{cm}^{-1}$ , che forniscono informazioni sulla struttura secondaria delle proteine e del collagene e sulla composizione degli acidi nucleici e carboidrati, sono stati calcolati gli spettri medi di ogni sottomappa (*Add selection rectangle* → *Extract data* → *Extract average spectrum*, OPUS 7.5 software package, Bruker Optics). Una volta ottenuti gli spettri medi, questi sono stati elaborati tramite procedura di Peak Fitting mediante l'analisi dei minimi sugli spettri in derivata seconda che consente di individuare l'esatta posizione, espressa in numeri d'onda, e il numero dei sottopicchi che compongono una banda convoluta. Le bande sono state ricostruite con la funzione Gaussiana utilizzando il software GRAMS/AI 9.1 (Galactic Industries, Inc., Salem, New Hampshire).

Le aree integrate dei sottopicchi sono state utilizzate per calcolare i seguenti rapporti di area delle bande:

- $A_{1315+1283}/A_{1640}$  (FOLDED/UNFOLDED) calcolato come il rapporto tra la somma delle aree delle bande a  $1315\text{ cm}^{-1}$  e  $1283\text{ cm}^{-1}$  (strutture  $\alpha$  e tripla elica, FOLDED) e la banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  (strutture random, UNFOLDED).
- $A_{1315}$  (ALFA ELICA) calcolato come area della banda a  $1315\text{ cm}^{-1}$  relativa alla struttura secondaria  $\alpha$  elica;
- $A_{1283}$  (TRIPLA ELICA) calcolato come l'area della banda a  $1283\text{ cm}^{-1}$  relativa alla struttura secondaria tripla elica;
- $A_{1640}$  (RANDOM COIL) calcolato come l'area della banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  relativa alle strutture secondarie random coil;
- $A_{1080}/A_{1240}$  (ACIDI NUCLEICI) calcolato come rapporto fra l'area del picco a  $1080\text{ cm}^{-1}$  (fosfati degli acidi nucleici) e la banda a  $1240\text{ cm}^{-1}$  (fosfati totali);
- $A_{964}/A_{1240}$  (DNA) calcolato come rapporto fra l'area del picco a  $964\text{ cm}^{-1}$  (DNA) e la banda a  $1240\text{ cm}^{-1}$  (fosfati totali);
- $A_{1122}/A_{1240}$ , calcolato come rapporto fra l'area del picco a  $1122\text{ cm}^{-1}$  (RNA) e la banda a  $1240\text{ cm}^{-1}$  (fosfati totali);

- $A_{1030}/A_{1080}$  (CARBOIDRATI) calcolato come rapporto fra l'area del picco a  $1030\text{ cm}^{-1}$  (glicogeno e carboidrati) e la banda a  $1080\text{ cm}^{-1}$  (fosfati degli acidi nucleici);
- $A_{1170}/A_{1160}$  (TUMOR INDEX) calcolato come rapporto fra l'area del picco a  $1170\text{ cm}^{-1}$  (C-OP) e del picco a  $1160\text{ cm}^{-1}$  (C-OH).

L'analisi statistica dei dati IR è stata eseguita tramite il software PRISM 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La significatività statistica è stata fissata a  $p < 0.05$  tramite analisi One-way ANOVA multiple comparison test.

## 4. RISULTATI

Durante il mio lavoro di tesi, mi sono dedicata alla caratterizzazione e differenziazione degli istotipi di leiomioma e leiomiosarcoma uterini tramite spettroscopia FTIR Imaging. I campioni sono stati prelevati tramite resezione chirurgica da pazienti con diagnosi di leiomioma e leiomiosarcoma. La coorte di pazienti è stata selezionata sulla base di specifici criteri di inclusione ed esclusione, come indicato nella sezione Parte sperimentale.

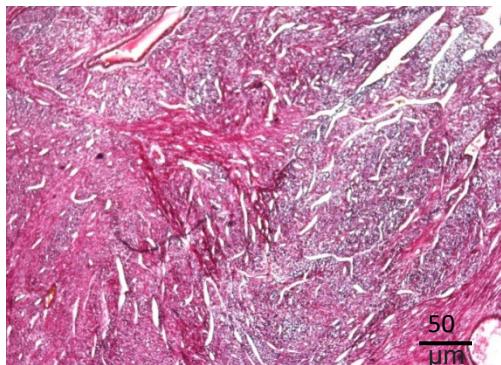
I campioni chirurgici sono stati suddivisi in base alla tipologia tumorale e ai diversi istotipi nei seguenti gruppi: N. 3 campioni leiomioma istotipo *Usual*; N. 3 campioni leiomioma istotipo *Cellular*; N. 1 campione leiomioma istotipo *Apoplectic*, N. 3 campioni leiomioma istotipo *Bizzarre* e N. 5 campioni di leiomiosarcoma (come descritto in tabella 3.1 nella sezione materiali e metodi). Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi istologica e FTIR Imaging, e i risultati sono di seguito riportati.

## **4.1 Confronto fra i dati istologici e spettrali relativi al leiomiosarcoma LMS e ai leiomiomi CL, US, BZ e AP**

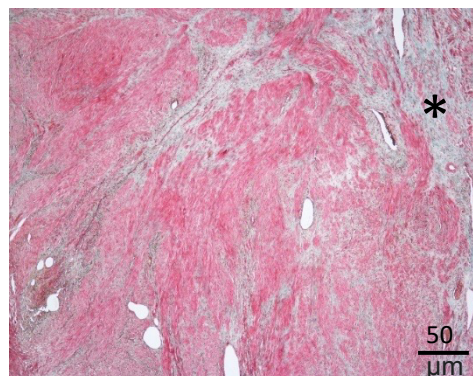
### *4.1.1 Analisi istologica*

L'analisi istologica è stata effettuata solo sui diversi istotipi di leiomioma, utilizzando le colorazioni H&E (dati non mostrati) e Masson's Tricromica, per ottenere una prima valutazione della quantità e della distribuzione del collagene in queste lesioni fibrotiche benigne. Tale colorazione, che permette di individuare la presenza del collagene (aree in verde), ha evidenziato nei quattro istotipi non solo una diversa distribuzione di tale proteina ma anche un differente quantitativo (Figura 4.1). Nel dettaglio: (i) nell'istotipo *cellular* (CL), il collagene risulta quasi assente (Figura 4.1A); (ii) nell'istotipo *usual* (US) si osserva una ridotta quantità di collagene poco organizzato (Figura 4.1B); (iii) l'istotipo *bizzarre* (BZ) mostra una maggiore quantità di collagene rispetto al precedente con una distribuzione anche in questo caso non omogenea (Figura 4.1C); infine (iv) l'istotipo *apoplectic* (AP) presenta abbondante collagene disposto in maniera uniforme (Figura 4.1D).

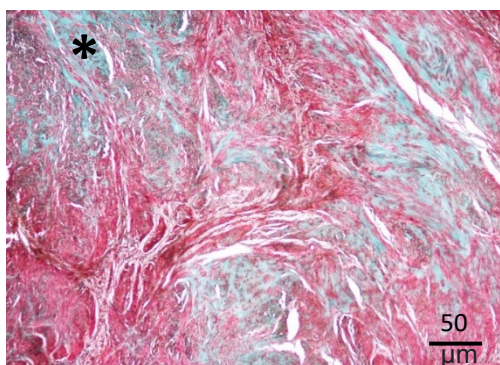
(A) Leiomioma *cellular*



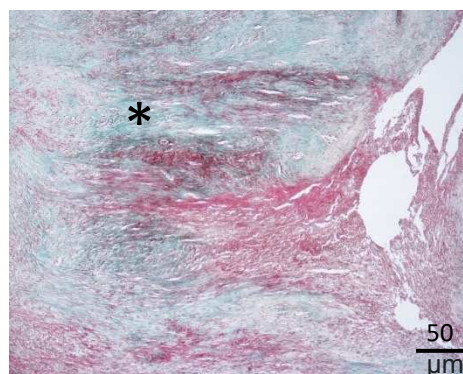
(B) Leiomioma *usual*



(C) Leiomioma *bizarre*



(D) Leiomioma *apoplectic*



**Figura 4.1:** Immagini istologiche con colorazione Masson's tricromica di sezioni rappresentative dei diversi istotipi di leiomioma; (A) Leiomioma *cellular*, (B) Leiomioma *usual*, (C) Leiomioma *bizarre* e (D) Leiomioma *apoplectic* (scale bar 50 µm).

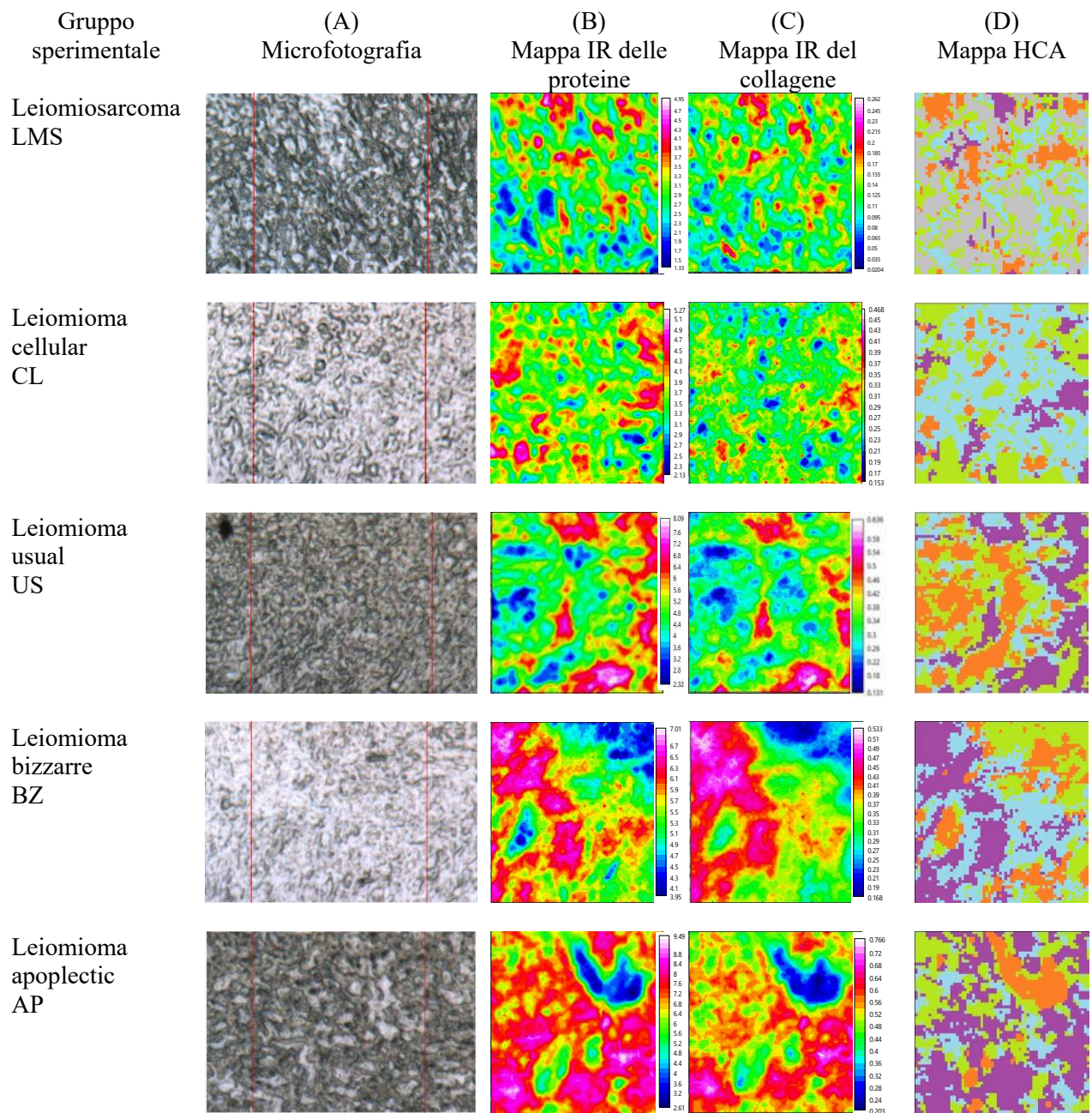
#### 4 1.2 Analisi imaging delle mappe IR

L'analisi delle immagini istologiche ha permesso di individuare le zone con maggior presenza di collagene su cui effettuare la successiva analisi FTIR Imaging. A tale proposito sono state acquisite mappe IR su sezioni adiacenti a quelle analizzate istologicamente, in modo da studiare le stesse aree, anche se con ingrandimenti diversi, avendo cura di scegliere regioni ricche di collagene per i vari leiomiomi, e regioni interne al tumore nel caso del leiomiosarcoma.

Lo scopo era quello di analizzare in maniera più dettagliata la distribuzione del collagene nel tessuto tumorale e valutare se tale collagene fosse dovuto a eventuali infiltrazioni del tumore nel connettivo o fosse prodotto dal tumore.

In Figura 4.2 sono riportate le microfotografie delle aree mappate e le relative immagini a falsi colori che rappresentano la distribuzione topografica delle proteine totali e del collagene all'interno dell'area mappata. Per ogni mappa IR sono inoltre riportate le immagini HCA (Hierarchical Cluster Analysis) che mostrano la presenza di diversi profili spettrali all'interno dell'area mappata e quindi di diverse componenti tissutali.

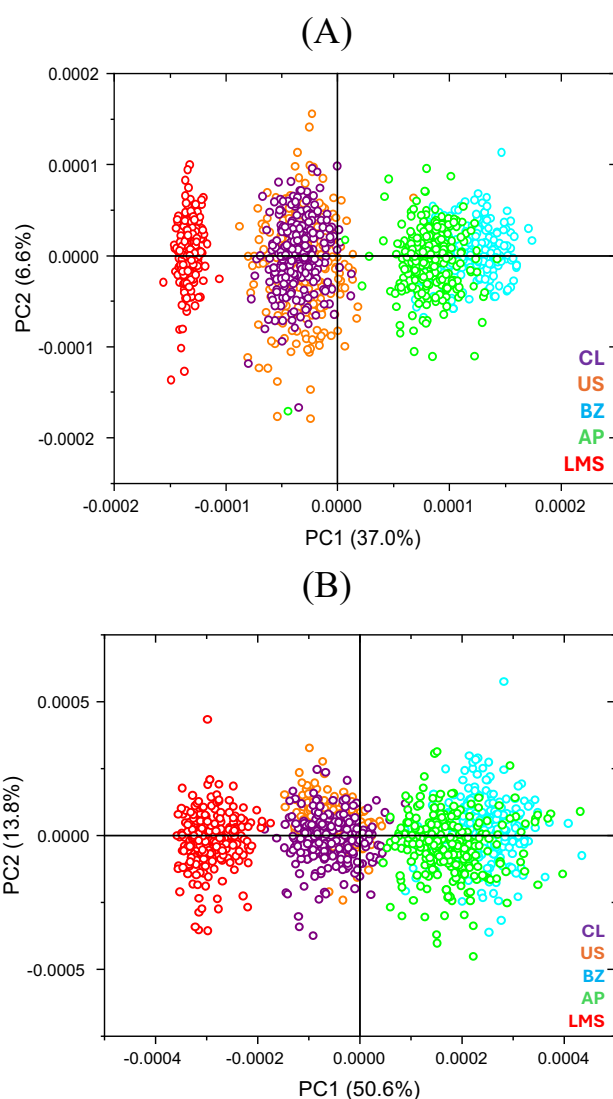
Le immagini a falsi colori evidenziano una differenza, sia tra il leiomiosarcoma e i leiomiomi, che fra i vari istotipi relativi alla lesione benigna. In particolare, in LMS si osserva una scarsa quantità di collagene, localizzato a spot, probabilmente dovuto all'infiltrazione del tumore nel connettivo. Per quanto riguarda i leiomiomi, l'analisi delle mappe IR conferma quanto osservato con l'istologia. Infatti, andando da CL, a US, BZ e AP, si nota sia un aumento del contenuto di collagene e una sua maggiore compattezza. Inoltre, l'analisi delle mappe HCA ha confermato nelle regioni con maggiore quantità di collagene la presenza di una popolazione spettrale specifica (cluster colorati in viola).



**Figura 4.2:** Analisi iperspettrale delle mappe IR dei vari gruppi sperimentali. (A) Microfotografia. Mappe IR relative alla distribuzione (B) delle proteine e (C) del collagene; le mappe IR sono state generate utilizzando una scala a falsi colori, dove il blu indica le aree con più bassi valori di assorbanza, mentre il bianco/rosa quelle con valori più elevati. (D) Mappa HCA; i diversi colori indica aree con diversi profili spettrale (cluster); in viola è rappresentato il cluster relativo alle aree ricche di collagene.

### 4.1.3 Analisi multivariata

Gli spettri estratti per ogni sezione nei cluster relativi al collagene sono stati quindi sottoposti a PCA al fine di evidenziare le differenze spettrali tra i gruppi sperimentali. In Figura 4.3 vengono riportati gli scores plots calcolati sugli spettri IR negli intervalli  $1360\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  e  $1750\text{-}1485\text{ cm}^{-1}$ .

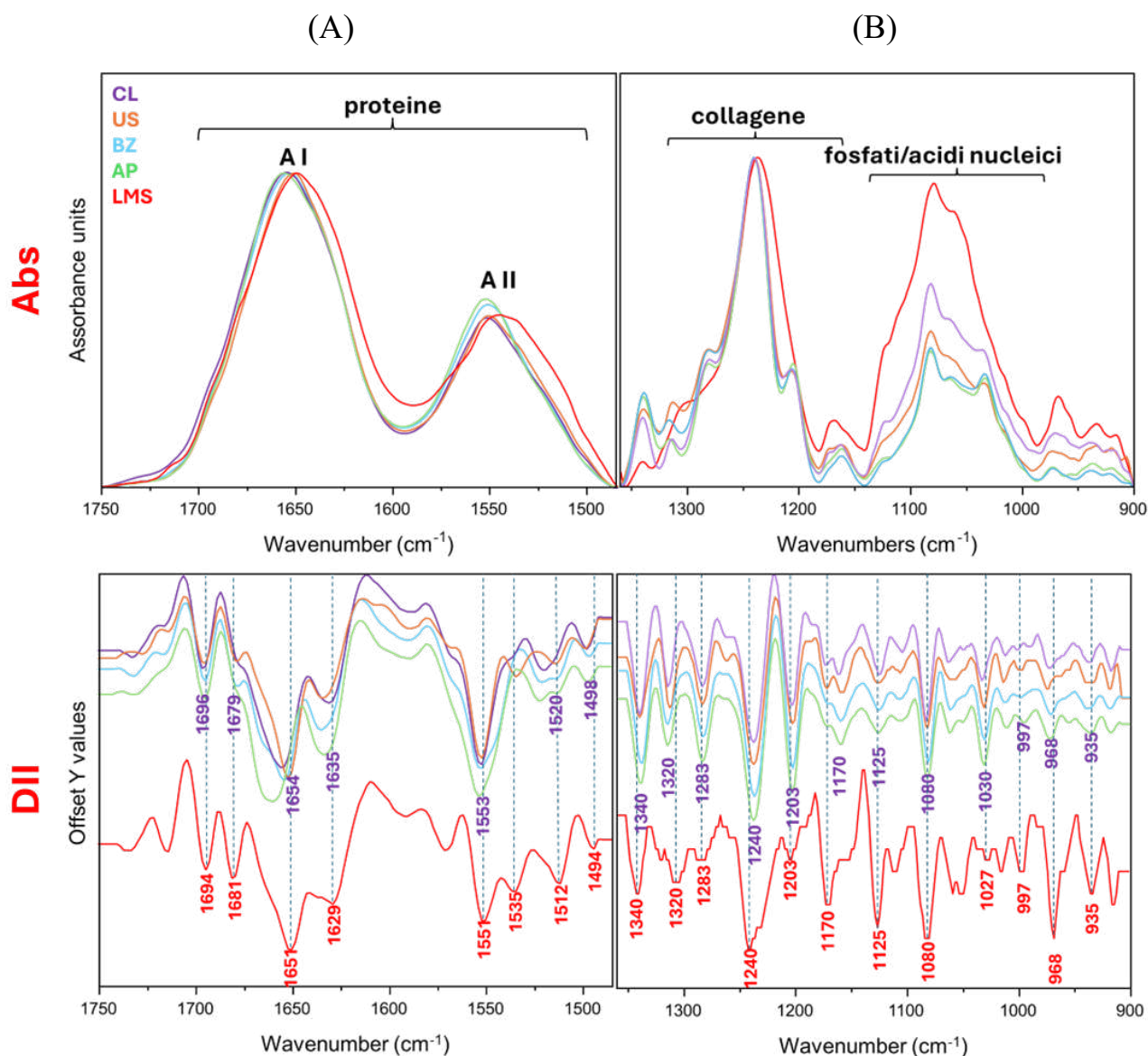


**Figura 4.3:** PCA scores plots delle popolazioni spettrali di CL, US, BZ, AP e LMS (analizzati in derivata seconda).

La PCA conferma che la matrice extracellulare è diversa sia fra i vari istotipi di leiomioma che rispetto al leiomiosarcoma. Nello specifico, nel range 1360-900  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.3A), si osserva: (i) una completa separazione fra LMS e i vari LM; (ii) gli istotipi US e CL risultano sovrapposti, come pure gli istotipi BZ e AP; (iii) US e CL si trovano dalla stessa parte di LMS e risultano separati da BZ e AP lungo PC1 (varianza 37.0%). Nel range 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.3B), si osserva uno stesso andamento; anche in questo caso, LMS è separato da tutti gli LM; US e CL si trovano dalla stessa parte di LMS e risultano separati da BZ e AP lungo PC1 (varianza 50.6%).

#### *4.1.4 Analisi spettrale*

In Figura 4.4 sono riportati gli spettri medi (in assorbanza Abs e in derivata seconda DII) di tutti i gruppi sperimentali nelle seguenti regioni spettrali: (A) 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$ , rappresentativa delle proteine, e (B) 1360-900  $\text{cm}^{-1}$ , rappresentativa del collagene, fosfati e acidi nucleici. Gli intervalli spettrali 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1480-1360  $\text{cm}^{-1}$ , tipici della componente lipidica, non sono stati presi in considerazione a causa della contemporanea presenza di picchi IR della paraffina, usata per includere i campioni di tessuto.



**Figura 4.4:** Spettri medi rappresentativi dei vari istotipi di leiomioma (Bizzarre BZ, Apoplectic AP, Usual US, Cellular CL) e del leiomiosarcoma (LMS) riportati sia in assorbanza (Abs) che in derivata seconda (DII), nelle regioni spettrali: (A) 1750-1485 cm<sup>-1</sup> e (B) 1360-900 cm<sup>-1</sup>. La posizione dei principali picchi IR è indicata lungo gli spettri in derivata seconda come numero d'onda, cm<sup>-1</sup>.

L'assegnazione delle principali bande presenti in tutti i gruppi sperimentali insieme con i modi vibrazionali e il relativo significato biologico è riportata in Tabella 4.1.

**Tabella 4.1.** Principali bande presenti negli spettri IR delle regioni dei leiomiomi (Usual, Cellular, Bizzarre, Apoplectic) e del leiomiosarcoma: posizione (numeri d'onda,  $\text{cm}^{-1}$ ), moti vibrazionali e relativa assegnazione biologica (Movasaghi et al., 2008; Belloni et al., 2022).

| Numeri d'onda<br>( $\text{cm}^{-1}$ ) | Moto vibrazionali                                                            | Assegnazione<br>biologica             |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| ~1694, ~1681, ~1651, ~1629            | Ammide I ( $\nu_{\text{C=O}}$ , $\nu_{\text{C-N}}$ , $\delta_{\text{N-H}}$ ) | Legame peptidico<br>COHN              |
| ~1551, ~1535, ~1512                   | Ammide II ( $\nu_{\text{C-N}}$ , $\delta_{\text{N-H}}$ )                     |                                       |
| ~1340                                 | Wagging dei gruppi $\text{CH}_2$                                             | Prolina                               |
| ~1320                                 | Struttura $\alpha$ elica                                                     | Collagene                             |
| ~1283, ~1240, ~1203                   | Ammide III                                                                   | Collagene                             |
| ~1170                                 | $\nu_{\text{C-OP}}$                                                          | Composti fosforilati,<br>non H-bonded |
| ~1160                                 | $\nu_{\text{C-OH}}$                                                          | Composti H-bonded                     |
| ~1125                                 | Vibrazione dell'RNA                                                          | RNA                                   |
| ~1240, ~1080                          | $\nu_{\text{asim}} \text{PO}_2^-$ e $\nu_{\text{sim}} \text{PO}_2^-$         | Acidi nucleici                        |
| ~1030                                 | $\delta \text{C-O}$                                                          | Glicogeno                             |
| ~997                                  | Vibrazione dell'uracile                                                      | RNA                                   |
| ~968                                  | Vibrazione dello scheletro del DNA                                           | DNA                                   |
| ~935                                  | Vibrazione dello Z-DNA                                                       | Z-DNA                                 |

In particolare:

*nell'intervallo 1750-1480  $\text{cm}^{-1}$* , si possono notare le bande Ammide I e II rispettivamente a ~1650  $\text{cm}^{-1}$  e ~1550  $\text{cm}^{-1}$ , relative alle vibrazioni del legame peptidico e dovute principalmente allo stretching dei legami C=O e C-N e al bending del legame N-H. Per quanto riguarda l'Ammide I, più diagnostica per la struttura secondaria delle proteine, in DII si osservano i seguenti picchi a: ~1694  $\text{cm}^{-1}$  ( $\beta$  sheet), ~1681  $\text{cm}^{-1}$  (3-turn elica), ~1651 ( $\alpha$  elica), ~1629 (random coil);

*nell'intervallo 1360-900 cm<sup>-1</sup>*, sono presenti i seguenti picchi attribuibili al collagene: ~1340 cm<sup>-1</sup> dovuto al wagging dei gruppi CH<sub>2</sub> della prolina, principale aminoacido del collagene, e ~1283 cm<sup>-1</sup> (tripla elica), ~1240 cm<sup>-1</sup> (α elica), e ~1203 cm<sup>-1</sup>, tipica forma a tricuspide rappresentativa del collagene, anche denominata Ammide III. Inoltre, si osservano i picchi relativi agli acidi nucleici: ~1125 cm<sup>-1</sup>, rappresentativo dell'RNA; ~1080 cm<sup>-1</sup>, dovuto allo stretching simmetrico dei gruppi fosfato caratteristici degli acidi nucleici e dei composti fosforilati; ~997 cm<sup>-1</sup>, stretching dell'uracile dell'RNA; ~968 cm<sup>-1</sup>, vibrazione dello scheletro del DNA e 935 cm<sup>-1</sup> vibrazione dello Z-DNA. Infine, il picco a ~1170 cm<sup>-1</sup>, stretching del legame C-OP, è caratteristico dei tessuti tumorali, mentre quello a ~1027 cm<sup>-1</sup>, indica la presenza di carboidrati e glicogeno.

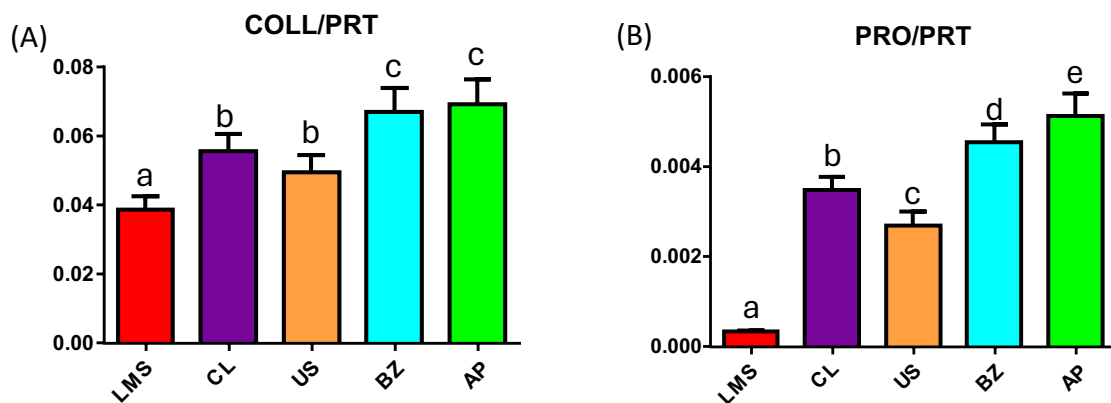
In generale, dall'analisi degli spettri si nota che le maggiori differenze spettrali fra i diversi istotipi di leiomioma e tra questi e il leiomiosarcoma si osservano nella regione spettrale 1360-900 cm<sup>-1</sup>: (i) la banda a ~1340 cm<sup>-1</sup> della prolina e la tipica tricuspide del collagene, composta dai picchi a ~1283 cm<sup>-1</sup>, ~1240 cm<sup>-1</sup> e ~1203 cm<sup>-1</sup>, diagnostiche per la presenza di tessuto connettivo, sono presenti solo nei LM; (ii) in LMS è presente invece la sola banda a ~1240 cm<sup>-1</sup>, in questo caso attribuibile ai gruppi fosfato di RNA e DNA e non al collagene; (iii) in LMS sono evidenti inoltre i picchi a ~1125 cm<sup>-1</sup>, ~1080 cm<sup>-1</sup>, ~968 cm<sup>-1</sup> e ~935 cm<sup>-1</sup>

(attribuibili agli acidi nucleici) che indicano la presenza di tessuto altamente cellulato, e (iv) sempre in LMS, si nota la presenza del picco a  $\sim 1170\text{ cm}^{-1}$ , tipico delle lesioni tumorali.

#### *4.1.5 Analisi univariata*

Per identificare dei marker spettrali capaci di migliorare la diagnosi dei diversi istotipi di LM e per differenziarli rispetto a LMS, sono stati analizzati specifici parametri spettrali relativi sia (1) al collagene che (2) alla componente cellulare.

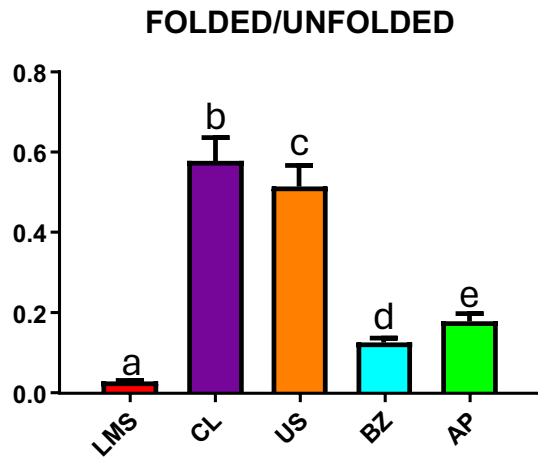
(1) Per quanto riguarda la quantità di collagene, abbiamo considerato i rapporti di area delle bande denominati PRO/PRT e COLL/PRT (ottenuti come descritto nella sezione Parte Sperimentale), rappresentativi rispettivamente della quantità relativa di prolina e di collagene rispetto alle proteine totali (Figura 4.5). Entrambi mostrano lo stesso andamento, con i valori massimi in BZ e AP ( $p < 0.05$ ), comparabili fra loro ( $p > 0.05$ ) e il valore più basso in LMS ( $p < 0.05$ ); US e CL presentano valori simili ( $p > 0.05$ ) e intermedi rispetto agli altri ( $p < 0.05$ ).



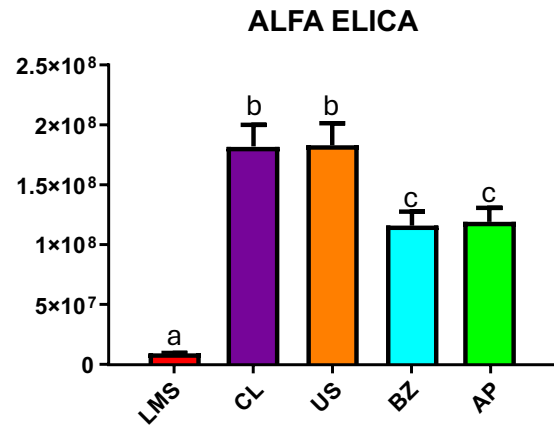
**Figura 4.5:** Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) COLL/PRT (rappresentativo della quantità relativa del collagene rispetto alle proteine totali); (B) PRO/PRT (rappresentativo della quantità relativa della prolina rispetto alle proteine totali). I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. La significatività statistica è stata calcolata tramite analisi One-Way ANOVA Multiple Comparison test tramite il software PRISM 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA). La significatività è stata settata a  $p < 0.05$ ; le lettere minuscole sopra gli istogrammi indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

Per quanto riguarda la struttura secondaria del collagene, l'analisi si è concentrata sui seguenti parametri spettrali, calcolati come riportato nella sezione Parte Sperimentale (Figura 4.6): ALFA ELICA, TRIPLA ELICA, RANDOM COIL, e FOLDED/UNFOLDED rappresentativi rispettivamente del contenuto di alfa elica, tripla elica, strutture random e rapporto fra strutture foldate e non foldate nel collagene.

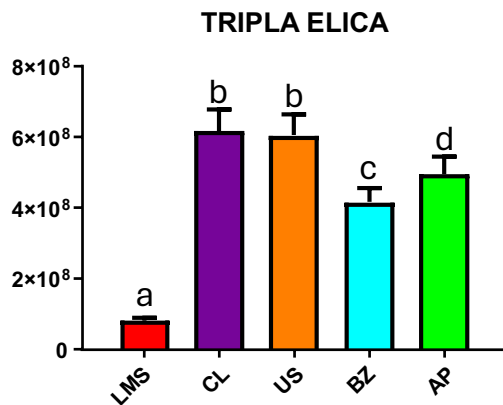
(A)



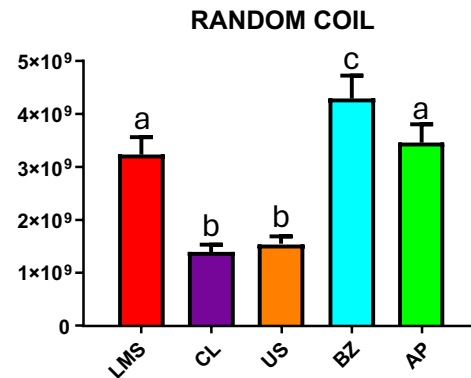
(B)



(C)



(D)

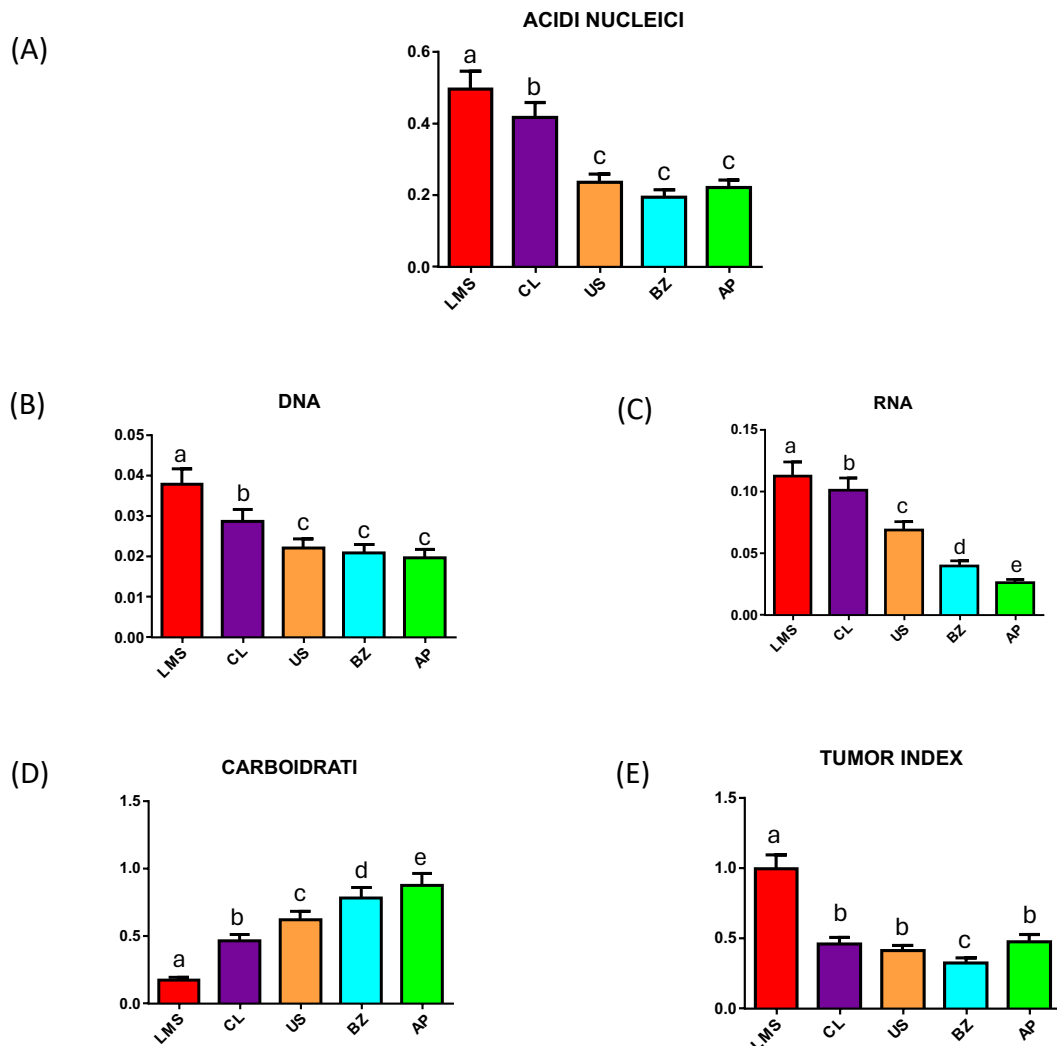


**Figura 4.6:** Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali, degli istotipi: (A) FOLDED/UNFOLDED (rappresentativo del rapporto fra strutture foldate e non foldate nel collagene); (B) ALFA ELICA (rappresentativo della quantità totale di strutture  $\alpha$ -elica nel collagene); (C) TRIPLA ELICA (rappresentativo della quantità totale di strutture a tripla elica nel collagene), e (D) RANDOM COIL (rappresentativo della quantità di strutture non foldate nel collagene). I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. La significatività statistica è stata calcolata tramite analisi One-Way ANOVA Multiple Comparison test tramite il software PRISM 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA). La significatività è stata settata a  $p < 0.05$ ; le lettere minuscole sopra gli istogrammi indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

L'analisi statistica mostra valori simili per CL e US e per BZ e AP, fra di loro non statisticamente significativi ( $p > 0.05$ ). Inoltre, come atteso, LMS ha i valori più

bassi di strutture foldate (Figura 4.6A) e in particolare di  $\alpha$ -elica e tripla elica (Figure 4.6B,C), mentre il contenuto di strutture random risulta alto (Figura 4.6D). In CL e US si evidenzia il più alto valore di strutture foldate (Figura 4.6A), e in particolare di alfa e tripla elica (Figure 4.6B,C) e il valore più basso di strutture random (Figura 4.6D). Infine, BZ e AP mostrano bassi valori di strutture foldate (Figura 4.6A) e alti valori di random (Figura 4.6C), più vicini a LMS; per quanto riguarda alfa elica e tripla elica, i valori sono intermedi fra LMS e CL/US (Figure 4.6B,C).

(2) Per quanto riguarda la componente cellulare, sono stati analizzati i seguenti parametri spettrali, calcolati come riportato nella sezione Parte Sperimentale (Figura 4.7):  $A_{1080}/A_{1240}$ , attribuibile al contenuto di acidi nucleici sui fosfati totali (ACIDI NUCLEICI);  $A_{964}/A_{1240}$ , attribuibile al contenuto di DNA sui fosfati totali (DNA);  $A_{1122}/A_{1240}$ , attribuibile al contenuto di RNA sui fosfati totali (RNA);  $A_{1030}/A_{1080}$ , attribuibile al contenuto di glicogeno e carboidrati in genere, rispetto agli acidi nucleici (CARBOIDRATI), e  $A_{1170}/A_{1160}$ , rapporto fra composti non H-bonded e H-bonded (soprattutto proteine), indice di tumorigenicità (TUMOR INDEX).



**Figura 4.7:** Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali in LMS e negli istotipi di leiomioma: (A) ACIDI NUCLEICI; (B) DNA; (C) RNA; (D) CARBOIDRATI e (E) TUMOR INDEX. I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. La significatività statistica è stata calcolata tramite analisi One-Way ANOVA Multiple Comparison test tramite il software PRISM 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA). La significatività è stata settata a  $p < 0.05$ ; le lettere minuscole sopra gli istogrammi indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

Dall'analisi statistica sopra riportata si osserva quanto segue: (i) LMS presenta il contenuto totale di acidi nucleici più alto (Figura 4.7A), statisticamente significativo rispetto a tutti gli istotipi di leiomioma ( $p < 0.05$ ); CL ha un valore

intermedio statisticamente significativo sia rispetto a LMS ( $p < 0.05$ ) che a US, BZ e AP ( $p < 0.05$ ) che hanno i valori più bassi e simili fra loro ( $p > 0.05$ ); (ii) lo stesso andamento si osserva per quanto riguarda il contenuto di DNA (Figura 4.7B); (iii) LMS mostra il più alto contenuto di RNA (Figura 4.7C), suggerendo la presenza di una zona tumorale altamente cellulata e in attiva proliferazione ( $p < 0.05$ ); tale parametro diminuisce in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) da CL, US, BZ e AP, indicando una diminuzione progressiva del contenuto cellulare; (iv) il contenuto di glicogeno e più in generale di carboidrati (Figura 4.7D) è minimo in LMS, e aumenta in maniera statisticamente significativa andando da CL, a US, BZ e AP ( $p < 0.05$ ); tale risultato suggerisce in LMS e CL un consumo elevato di zuccheri a causa della presenza di cellule in attiva proliferazione; (v) il LMS si ha un valore più alto del TUMOR INDEX, indicativo della presenza di lesioni maligne (Figura 4.7E); i vari istotipi di LM mostrano valori molto più bassi e simili fra loro ( $p > 0.05$ ).

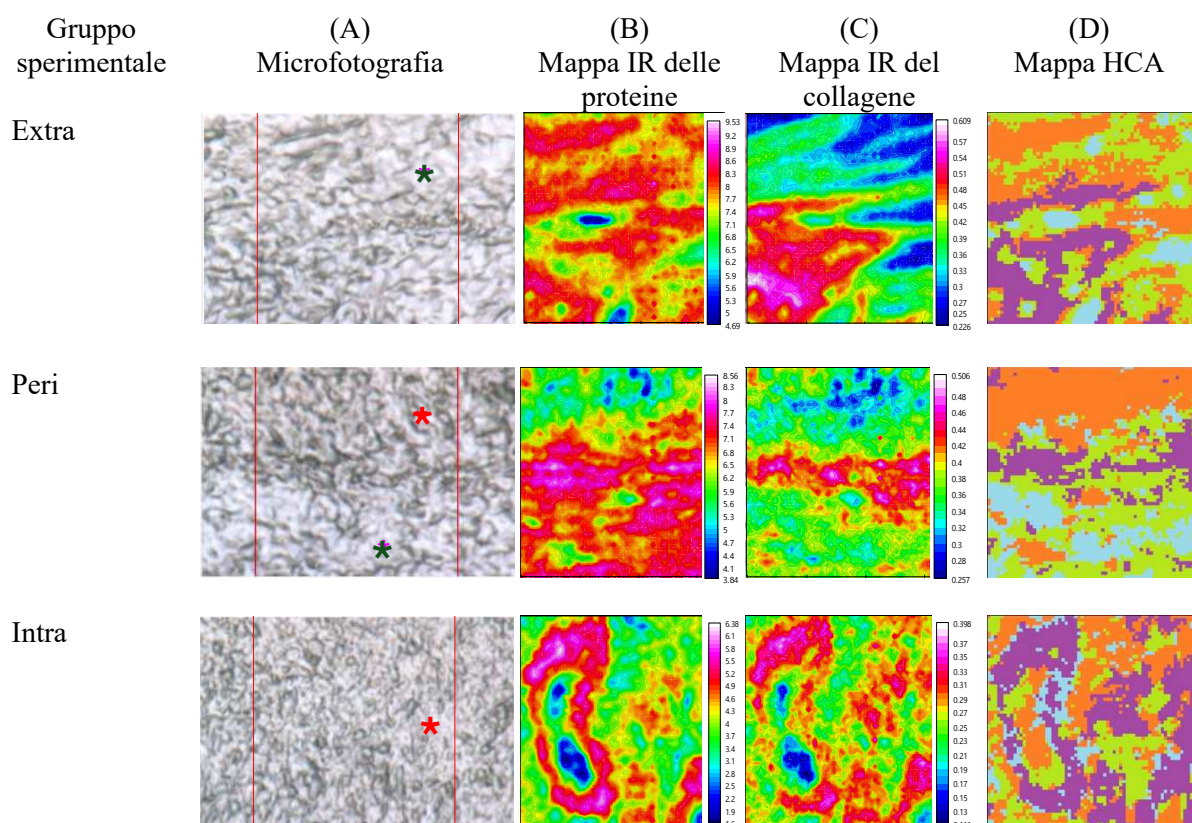
## **4.2 Analisi imaging delle regioni intra, peri ed extratumorale nel leiomioma Cellular**

### *4.2.1 Analisi imaging delle mappe IR*

La stessa analisi è stata eseguita sulle regioni intra, extra e peritumorale dei campioni di leiomioma *cellular*. Dalle immagini a falsi colori, riportate nella

Figura 4.8, si possono evidenziare delle caratteristiche specifiche del fronte del tessuto tumorale.

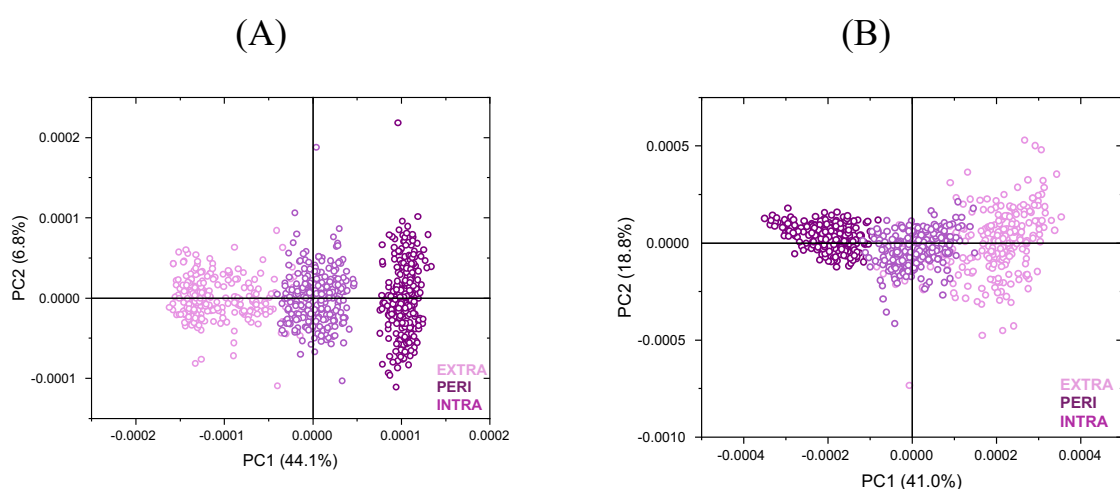
In particolare, nel tessuto intratumorale si osserva una scarsa quantità di collagene, localizzato a spot. Per quanto riguarda la zona extratumorale si nota sia un aumento del contenuto di collagene che una sua maggiore organizzazione. Infine, nel fronte del tumore si nota una limitata quantità di collagene rispetto alla zona extratumorale. Inoltre, l'analisi delle mappe HCA ha confermato nelle regioni con maggiore quantità di collagene la presenza di una popolazione spettrale specifica (cluster colorati in viola).



**Figura 4.8:** Analisi iperspettrale delle mappe IR dei vari gruppi sperimentali: (A) Microfotografia con asterischi rosso (tumore) e blu (miometrio); mappe IR relative alla distribuzione (B) delle proteine e (C) del collagene, e (D) mappa HCA. Le immagini a falsi colori sono state generate utilizzando la scala colorimetrica dal blu che indica le aree con bassi valori di assorbanza, al bianco/rosa che indicano le aree con valori più elevati di assorbanza.

#### 4.2.2 Analisi multivariata

Gli spettri estratti per ogni sezione nei cluster relativi al collagene, sono stati quindi sottoposti PCA (Principal Component Analysis) al fine di evidenziare la presenza di eventuali differenze spettrali tra le diverse zone tumorali. In Figura 4.9 vengono riportati gli scores plots relativi ai range spettrali 1360-900  $\text{cm}^{-1}$  e 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$ .



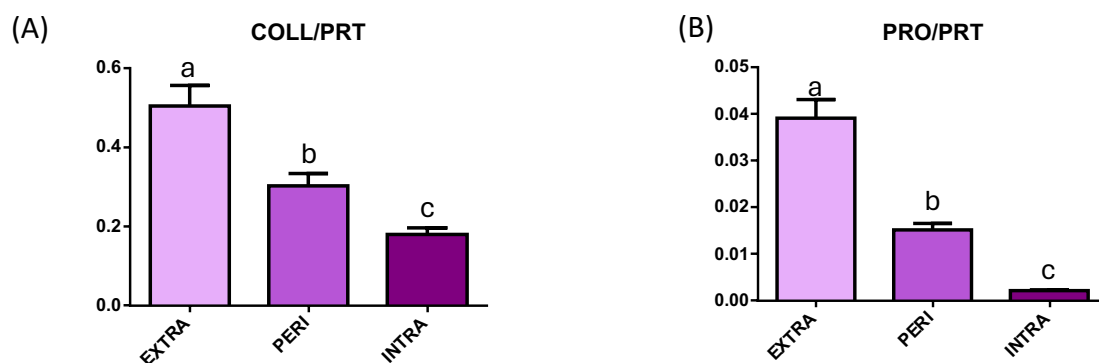
**Figura 4.9:** PCA scores plots delle popolazioni spettrali di EXTRA, PERI, INTRA (analizzati in derivata seconda).

La PCA conferma che la matrice extracellulare è diversa anche nelle diverse zone tumorali. Nello specifico, nel range 1360-900  $\text{cm}^{-1}$ , si osserva una distinzione fra

EXTRA, INTRA e PERI; infatti, risultano separati lungo PC1 (varianza 44.1%). Nel range 1750-1485  $\text{cm}^{-1}$ , la segregazione, seppur meno evidente rispetto al range precedente, ha lo stesso andamento (varianza 41.0%).

#### *4.2.3 Analisi univariata*

Per meglio evidenziare le differenze fra il tumore e il tessuto sano e per verificare se l'infiltrazione del tumore all'interno del miometrio altera la composizione della matrice extracellulare, e quindi del collagene, è stata effettuata l'analisi statistica di rapporti di area delle bande denominati PRO/PRT e COLL/PRT (ottenuti come descritto nella sezione Parte Sperimentale), rappresentativi rispettivamente della quantità relativa di prolina e di collagene rispetto alle proteine totali (Figura 4.10). L'andamento di tipo crescente del rapporto COLL/PRT da EXTRA a INTRA conferma l'aumento nella quantità di collagene messa in evidenza dall'analisi delle mappe IR: infatti, la zona extratumorale mostra valori di collagene statisticamente più elevati rispetto alla peri ed intra ( $p < 0.05$ ). Lo stesso andamento è stato ottenuto anche per il rapporto PRO/PRT, dove il più basso valore riscontrato nella zona INTRA ( $p < 0.05$ ) conferma la riduzione della distribuzione del collagene nella zona tumorale.



**Figura 4.10:** Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) COLL/PRT (rappresentativo della quantità relativa del collagene rispetto alle proteine totali); (B) PRO/PRT (rappresentativo della quantità relativa della prolina rispetto alle proteine totali). I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. La significatività statistica è stata calcolata tramite analisi One-Way ANOVA Multiple Comparison test tramite il software PRISM 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA). La significatività è stata settata a  $p < 0.05$ ; le lettere minuscole sopra gli istogrammi indicano le differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

## 5. DISCUSSIONE

Il leiomioma uterino è un tumore benigno, estremamente diffuso sia fra le donne in età fertile che in età avanzata, caratterizzato da un'aumentata proliferazione di cellule muscolari e da un'alterata produzione di matrice extracellulare di natura disorganizzata rispetto al tessuto miometriale.

Attualmente la diagnosi di tale lesione benigna avviene mediante tecniche di imaging. Tuttavia, la presenza di diversi istotipi con caratteristiche in alcuni casi simili a quelle delle lesioni maligne, quali il leiomiosarcoma, che è una forma tumorale derivata da cellule muscolari lisce appartenente ai sarcomi, rende la diagnosi differenziale complessa e provoca incertezza nella prognosi.

La Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica analitica estremamente interessante che consente di osservare e caratterizzare, nei tessuti tumorali, le alterazioni nella struttura e composizione delle principali macromolecole, arrivando quindi a identificare dei possibili marker spettrali specifici per le diverse lesioni e quindi utili per una diagnosi più precisa e più certa.

Nel presente studio mi sono dedicata all'analisi di campioni di leiomiosarcoma e leiomioma con diversi istotipi (*Usual, Cellular, Bizzarre, Apoplectic*) avvalendomi di un approccio di tipo multidisciplinare basato sulla combinazione della spettroscopia FTIR Imaging con l'istologia e l'analisi statistica (multivariata

e univariata). Lo studio è stato focalizzato dapprima sul collagene presente nelle diverse lesioni benigne e maligne e quindi esteso alla componente cellulare.

Per quanto riguarda il collagene, le immagini istologiche colorate con Masson Tricromica hanno evidenziato negli istotipi CL e US, un basso contenuto di collagene, associato anche ad una distribuzione a spot. Al contrario in BZ e AP, la quantità di collagene è maggiore, anche se la distribuzione appare non omogenea. Questi risultati sono stati anche confermati dall'analisi delle mappe IR, da cui emerge che le lesioni benigne con istotipi BZ e AP mostrano un elevato contenuto di collagene e prolina (mappe IR COLL e PRT, e rapporti COL/PRT e PRO/PRT), al contrario di US, CL e del leiomiomasarcoma (LMS). L'analisi IR ci ha permesso di valutare non solo la quantità di collagene presente nei diversi gruppi sperimentali, ma anche la sua organizzazione strutturale. In particolare, una maggiore organizzazione del collagene (rapporti FOLDED/UNFOLDED, ALFA ELICA e TRIPLA ELICA) è stata osservata in CL e US, mentre BZ e AP sembrano più caratterizzati da una componente proteica più disorganizzata.

Per quanto riguarda la componente cellulare, LMS presenta un valore più elevato per quanto riguarda il contenuto di acidi nucleici (rapporti ACIDI NUCLEICI, DNA e RNA), e una minore quantità di glicogeno e carboidrati (CARBOIDRATI), in entrambi i casi seguito nell'ordine da CL, US, BZ e AP. Ciò suggerisce la presenza in LMS, e in misura minore ma comunque rilevante in CL, di un tessuto

altamente cellulato e in attiva proliferazione. BZ e AP al contrario mostrano scarsa quantità di componente cellulare e maggiore presenza di collagene (rapporti COLL/PRT e PRO/PRT).

Un parametro molto interessante per rilevare la presenza di lesioni maligne risulta essere il rapporto  $A_{1170}/A_{1160}$ , definito TUMOR INDEX); questo parametro è correlato alla presenza di proteine fosforilate e può essere considerato un indice di tumorigenicità. Come atteso, LMS presenta il valore più alto rispetto a tutti gli istotipi di leiomioma.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può quindi affermare che tutti i parametri spettrali sopra discussi possono essere identificati come marker utili per migliorare la diagnosi differenziale tra LMS e gli istotipi di leiomioma.

In generale, la differenza a livello spettrale fra la lesione maligna LMS e i leiomiomi LM a carattere benigno è evidente, sia per quanto riguarda il profilo spettrale in generale (analisi degli scores plot della PCA) che nel caso dei parametri relativi al collagene; molto utili anche i parametri ACIDI NUCLEICI, DNA, CARBOIDRATI e TUMOR INDEX, che presentano una notevole differenza in termini di significatività statistica. In particolare, si può affermare che nei leiomiomi CL e US la componente cellulare è molto presente ed il poco collagene presente è dovuto alla infiltrazione del tumore benigno nel connettivo (collagene ben organizzato). Al contrario, BZ e AP hanno un maggiore contenuto

di collagene, che viene prodotto dalla lesione stessa e quindi ha caratteristiche strutturali più disordinate. LMS presenta un elevato grado di malignità; il collagene è scarsamente presente, dovuto alla infiltrazione della lesione nel connettivo e la componente cellulare è predominante.

L'analisi FTIR Imaging ha permesso inoltre di differenziare tra LMS e BZ: il leiomioma BZ presenta infatti cellule molto simili a quelle del leiomiosarcoma e per questo motivo viene spesso classificato come STUMP (tumore muscolare liscio dal potenziale di malignità incerto). Interessante è anche la sovrapposizione nella PCA delle popolazioni spettrali relative a CL e US, che mostrano anche valori simili nei vari parametri spettrali. Questo risultato sembra confermare quanto riportato in studi recenti che ipotizzano che l'istotipo CL sia un primo stadio di US.

Negli ultimi anni, la comunità scientifica, ha posto particolare attenzione alla composizione macromolecolare della matrice extracellulare in quanto, si è ipotizzato che la formazione del leiomioma uterino sia una conseguenza di una risposta infiammatoria impropria con protagonisti i miofibroblasti che svolgono il ruolo di depositare grande quantità di collagene nel tessuto del leiomioma (Islam et al., 2018). Pertanto, vista la correlazione tra il cambiamento della matrice e la massa tumorale, studi recenti hanno dimostrato che le modifiche a

livello di composizione macromolecolare possono essere utilizzate come marker a scopo diagnostico.

A tale proposito, nell'ultimo periodo di tesi ho iniziato ad occuparmi della caratterizzazione morfo-chimica della matrice extracellulare delle regioni extra, peri ed intratumorali nei leiomioma *Cellular e Usual* al fine di investigare se l'infiltrazione del tumore all'interno del miometrio sano ne altera la composizione e verificare l'ipotesi che questi due istotipi siano correlati fra loro. Lo studio è tutt'ora in corso ma i primi risultati hanno evidenziato un quantitativo di collagene maggiore nella zona extratumorale rispetto alle zone peri ed intratumorali (immagini COLL/PRT e PRO/PRT).

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, dai risultati ottenuti, è possibile dimostrare che la spettroscopia FTIR Imaging, in sinergia con l'analisi istologica e statistica, può essere considerato un valido strumento per migliorare e rendere più accurata la diagnosi differenziale tra leiomioma e leiomiosarcoma uterino. Nello specifico, l'analisi IR ha permesso di individuare nuovi marker spettrali relativi alle caratteristiche morfo-chimiche del tessuto delle lesioni benigne rispetto alla lesione maligna, evidenziando un maggior contenuto di acidi nucleici e minore quantità di glicogeno nel leiomiosarcoma rispetto al leiomioma e tra gli istotipi del leiomioma. Inoltre, sempre tra le lesioni coinvolte, si è rilevata una differenza nel contenuto e nelle caratteristiche strutturali e topografiche del collagene rendendolo un valido marker spettrale. È stato inoltre possibile analizzare il contenuto di collagene presente nella zona extra, peri ed intratumorale al fine di investigare se l'infiltrazione del tumore all'interno del miometrio sano ne altera la composizione.

Come prospettiva futura, si prevede una analisi simile per quanto riguarda il leiomioma *Usuale*, al fine di verificare l'ipotesi di una possibile correlazione con l'istotipo *Cellulare*.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Al-Nafussi, A. (2004). Uterine smooth-muscle tumours: Practical approach to diagnosis. *Current Diagnostic Pathology*, 10(2), 140–156. [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(03\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(03)00072-3)
- Anastasi. *Trattato di Anatomia Umana* 4/ed. Voll. 1/3 [Balboni—Edi Ermes], da <https://www.medicalinformation.it/catalog/product/view/id/11719/s/trattato-di-anatomia-umana-4-anastasi-balboni-motta-edi-ermes-editore-9788870512854/>
- Aninye, I. O., Laitner, M. H., & Society for Women’s Health Research Uterine Fibroids Working Group. (2021). Uterine Fibroids: Assessing Unmet Needs from Bench to Bedside. *Journal of Women’s Health*, 30(8), 1060–1067. <https://doi.org/10.1089/jwh.2021.0280>
- Assikis, V. J., Neven, P., Jordan, V. C., & Vergote, I. (1996). A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 32(9), 1464–1476. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00184-0](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00184-0)
- Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., & Schectman, J. M. (2003). High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: Ultrasound evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188(1), 100–107. <https://doi.org/10.1067/mob.2003.99>
- Belloni, A., Notarstefano, V., Greco, S., Pellegrino, P., Giorgini, E., & Ciarmela, P. (2024). FTIR Microspectroscopy as a new probe to study human uterine lesions: Characterization of tumor cell lines from uterine smooth muscle cells and evaluation of EPA and DHA in vitro treatments. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1870(1), 166873. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166873>
- Benson, C., & Miah, A. B. (2017). Uterine sarcoma – current perspectives. *International Journal of Women’s Health*, 9, 597–606. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S117754>

- Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(3 Suppl 2), S4-7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.07.045>
- Chiaffarino, F., Parazzini, F., La Vecchia, C., Chatenoud, L., Di Cintio, E., & Marsico, S. (1999). Diet and uterine myomas. *Obstetrics and Gynecology*, 94(3), 395–398. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(99\)00305-1](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(99)00305-1)
- Chiappe, C., D'Andrea, F., & Abbandonato, G. (2011). Tecniche spettroscopiche e identificazione di composti organici. Problemi svolti e da svolgere. Edizioni ETS.
- Ciavattini, A., Delli Carpini, G., Moriconi, L., Clemente, N., Orici, F., Boschi, A. C., Montik, N., & Mazzanti, L. (2017). The association between ultrasound-estimated visceral fat deposition and uterine fibroids: An observational study. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 33(8), 634–637. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1302418>
- Cook, H., Ezzati, M., Segars, J. H., & McCarthy, D. (2010). The Impact of Uterine Leiomyomas on Reproductive Outcomes. *Minerva ginecologica*, 62(3), 225–236.
- Felix, A. S., Cook, L. S., Gaudet, M. M., Rohan, T. E., Schouten, L. J., Setiawan, V. W., Wise, L. A., Anderson, K. E., Bernstein, L., De Vivo, I., Friedenreich, C. M., Gapstur, S. M., Goldbohm, R. A., Henderson, B., Horn-Ross, P. L., Kolonel, L., Lacey, J. V., Liang, X., Lissowska, J., ... Brinton, L. A. (2013). The etiology of uterine sarcomas: A pooled analysis of the epidemiology of endometrial cancer consortium. *British Journal of Cancer*, 108(3), 727–734. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.2>
- Ferrero, S., & Gorlero, F. (2021). *Fibromi uterini: Patogenesi, diagnosi e terapia (Prima edizione)* SEU.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>

- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Giuliani, E., As-Sanie, S., & Marsh, E. E. (2020). Epidemiology and management of uterine fibroids. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 149(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13102>
- Guo, E., Li, C., Hu, Y., Zhao, K., Zheng, Q., & Wang, L. (2022). Leiomyoma with Bizarre Nuclei: A Current Update. *International Journal of Women's Health*, 14, 1641–1656. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S388278>
- Habiba, M., Brosens, I., Zannoni, G. F., & Benagiano, G. (2019a). Uncommon Mixed Endometrial-Myometrial Benign Tumors of the Reproductive Tract: Literature Review. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 84(6), 521–547. <https://doi.org/10.1159/000499019>
- Harlow, B. L., Weiss, N. S., & Lofton, S. (1986). The epidemiology of sarcomas of the uterus. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(3), 399–402.
- Islam, M. S., Ciavattini, A., Petraglia, F., Castellucci, M., & Ciarmela, P. (2018). Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: A potential target for future therapeutics. *Human Reproduction Update*, 24(1), 59–85. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx032>
- Jayes, F., Liu, B., Feng, L., Aviles-Espinoza, N., Leikin, S., & Leppert, P. (2019). Evidence of biomechanical and collagen heterogeneity in uterine fibroids. *PLOS ONE*, 14, e0215646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215646>
- La Vecchia, C., Decarli, A., Fasoli, M., & Gentile, A. (1986). Nutrition and diet in the etiology of endometrial cancer. *Cancer*, 57(6), 1248–1253. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860315\)57:6<1248::aid-cnrc2820570631>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860315)57:6<1248::aid-cnrc2820570631>3.0.co;2-v)

- Laughlin, S. K., & Stewart, E. A. (2011). Uterine Leiomyomas: Individualizing the Approach to a Heterogeneous Condition. *Obstetrics & Gynecology*, 117(2), 396–403. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31820780e3>
- Leppert, P. C., Baginski, T., Prupas, C., Catherino, W. H., Pletcher, S., & Segars, J. H. (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertility and Sterility*, 82 Suppl 3(0 3), 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.030>
- Makker, A., & Goel, M. M. (2013). Uterine Leiomyomas: Effects on Architectural, Cellular, and Molecular Determinants of Endometrial Receptivity. *Reproductive Sciences*, 20(6), 631–638. <https://doi.org/10.1177/1933719112459221>
- Mansour, T., & Chowdhury, Y. S. (2024). Endometrial Polyp. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557824/>
- Martini, F. H., Cocco, L., Gaudio, E., Manzoli, L., & Zummo, G. (2019). *Anatomia umana* (7<sup>o</sup> edizione). Edises.
- Mbatani, N., Olawaiye, A. B., & Prat, J. (2018). Uterine sarcomas. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 143 Suppl 2, 51–58. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12613>
- McWilliams, M. M., & Chennathukuzhi, V. M. (2017). Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35(2), 181–189. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599090>
- Menon, G., Mangla, A., & Yadav, U. (2024). Leiomyosarcoma. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551667/>

- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, Dr. I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179.  
<https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Notarstefano, V., Belloni, A., Sabbatini, S., Pro, C., Orilisi, G., Monterubbianesi, R., Tosco, V., Byrne, H. J., Vaccari, L., & Giorgini, E. (2021). Cytotoxic Effects of 5-Azacytidine on Primary Tumour Cells and Cancer Stem Cells from Oral Squamous Cell Carcinoma: An In Vitro FTIRM Analysis. *Cells*, 10(8), 2127. <https://doi.org/10.3390/cells10082127>
- OnLine, S. di M. (2017, dicembre 18). Differenza tra collo dell'utero e cervice. *MEDICINA ONLINE*. <https://medicinaonline.co/2017/12/18/differenza-tra-collo-dellutero-e-cervice/>
- Ono, M., Bulun, S. E., & Maruyama, T. (2014). Tissue-Specific Stem Cells in the Myometrium and Tumor-Initiating Cells in Leiomyoma. *Biology of Reproduction*, 91(6), 149.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.123794>
- Ostetricia e Ginecologia. (s.d.). Edizioni Idelson Gnocchi  
<https://www.idelsongnocchi.com/shop/prodotto/trattato-di-ostetricia-e-ginecologia/>
- Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., & Cohen, R. E. (2002). Collagen: An overview. *Implant Dentistry*, 11(3), 280–285. <https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00014>
- Pavone, D., Clemenza, S., Sorbi, F., Fambrini, M., & Petraglia, F. (2018). Epidemiology and Risk Factors of Uterine Fibroids. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 46, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.09.004>
- Protic, O., Toti, P., Islam, M. S., Occhini, R., Giannubilo, S. R., Catherino, W. H., Cinti, S., Petraglia, F., Ciavattini, A., Castellucci, M., Hinz, B., & Ciarmela, P. (2016). Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell and Tissue Research*, 364(2), 415–427. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2324-3>

- Querido, W., Kandel, S., & Pleshko, N. (2021). Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*, 26(4), 922.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26040922>
- Raglan, O., Kalliala, I., Markozannes, G., Cividini, S., Gunter, M. J., Nautiyal, J., Gabra, H., Paraskevaidis, E., Martin-Hirsch, P., Tsilidis, K. K., & Kyrgiou, M. (2019). Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *International Journal of Cancer*, 145(7), 1719–1730. <https://doi.org/10.1002/ijc.31961>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978–a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Ross, R. K., Pike, M. C., Vessey, M. P., Bull, D., Yeates, D., & Casagrande, J. T. (1986). Risk factors for uterine fibroids: Reduced risk associated with oral contraceptives. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 293(6543), 359–362.
- Togni, L., Furlani, M., Belloni, A., Riberti, N., Giuliani, A., Notarstefano, V., Santoni, C., Giorgini, E., Rubini, C., Santarelli, A., & Mascitti, M. (2024). Biomolecular alterations temporally anticipate microarchitectural modifications of collagen in oral tongue squamous cell carcinoma. *iScience*, 27(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110303>
- Tumore utero: Sintomi, prevenzione, cause, diagnosi. (s.d.)  
<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-dellutero>
- Van Der Rest, M., & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5(13), 2814–2823. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916105>
- Watanabe, K., & Suzuki, T. (2006). Uterine leiomyoma versus leiomyosarcoma: A new attempt at differential diagnosis based on their cellular characteristics. *Histopathology*, 48(5), 563–568.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02368.x>

- Wolańska, M., Sobolewski, K., Drożdżewicz, M., & Bańkowski, E. (1998). Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189(1), 145–152. <https://doi.org/10.1023/A:1006914301565>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>

## **RINGRAZIAMENTI**

Un ringraziamento speciale alla Prof.ssa Elisabetta Giorgini, che con grande professionalità e umanità mi ha accompagnato in questo percorso. Un sentito ringraziamento va anche alla Prof.ssa Pasquapina Ciarmela per il supporto e i consigli che hanno arricchito questo lavoro.

Ringrazio alla dott.ssa Chiara Santoni che con pazienza e competenza mi ha accompagnato passo dopo passo in questo percorso. Grazie di cuore.

Alla mia famiglia, il mio più grande ringraziamento. Grazie per avermi sempre sostenuto, incoraggiato e spronato a dare il meglio di me. Il vostro amore, la vostra pazienza e la vostra fiducia in me sono stati la mia forza più grande in ogni momento di questo percorso.

Infine, un grazie di cuore a Federico, che con affetto, comprensione e infinito supporto mi è stato accanto in ogni momento. La tua presenza ha reso questo viaggio meno faticoso e più speciale, e per questo ti sarò sempre grata.