

Titolo: “Dagli sferoidi tumorali ai tumoroidi (S2T): modelli tumorali mediante inclusione dello stroma e controllo delle proprietà meccaniche della matrice per selezionare opzioni terapeutiche in medicina di precisione.”

Tutor: Prof. Dario de Biase

Progetto di ricerca

Secondo l'OMS (dati del 2020), il 30% delle morti premature per malattie non trasmissibili sono dovute al cancro. La maggior parte dello sviluppo di nuovi farmaci antitumorali viene effettuata ad oggi su modelli cellulari. Sono però necessari modelli di tumore in grado di rappresentare meglio la complessità delle neoplasie umane sia per studi della biologia del cancro, sia per ridurre il tasso di fallimento dei farmaci antitumorali approvati preclinicamente negli studi clinici (ora stimato al 97%). Il modello più complesso attualmente disponibile è considerato quello dei topi PDX (*patient derived xenograft*) in cui un frammento di tumore di un paziente è impiantato in un topo privo del sistema immunitario al fine di iniziare una banca viva del tessuto cellulare. Stanno facendosi luce proposte (e studi clinici già in corso) per estendere questa procedura anche al test dell'efficacia degli antitumorali nel contesto della medicina personalizzata. Secondo questa tendenza, si prevede un forte aumento dell'impiego di animali per lo sviluppo dei farmaci e per la verifica dell'approccio terapeutico su coorti sempre crescenti di pazienti. Sono necessari modelli *in vitro* dei tumori che possano riassumere la complessità dei tumori e aumentare l'efficienza delle fasi di sviluppo dei farmaci. Allo stesso tempo sarà necessario ottenere questo tipo di modelli avanzati *in vitro* a partire dal tumore di ogni singolo paziente, per supportare la scelta terapeutica. L'avanzamento e la diffusione di modelli *in vitro* complessi dei tumori, in grado di riassumere tutto il microambiente tumorale (TME), porterebbe ad una sostituzione dell'impiego del modello animale (difficile da usare, incompleto e costoso) per le applicazioni sopra menzionate.

Il microambiente tumorale è un ambiente complesso di diversi tipi di cellule (tumorali e non tumorali), matrice extracellulare e sostanze chimiche che sono cruciali per lo sviluppo del cancro e per la sua risposta ai trattamenti farmacologici. I modelli cellulari *in vitro* (2D e 3D) sono generalmente limitati in quanto non riescono attualmente a rappresentare la complessità del TME. Inoltre, spesso anche i modelli di cancro 3D relativamente semplici non sono adatti a saggi paralleli ad alto rendimento in quanto mancano dell'omogeneità e della riproducibilità necessarie per il trattamento automatizzato e statistico.

Il presente progetto mira a sviluppare nuove procedure che permettano di ottenere colture 3D di cellule tumorali costituite di diverse tipologie di cellule e di matrice di supporto. Le procedure saranno svolte in micropozzetti fabbricati *ad hoc* dai proponenti in materiali elastomerici e in idrogel, tali da evitare il contatto con le plastiche e mimare, insieme a opportune matrici, le proprietà meccaniche del TME. I *microwell*, progettati per ottenere un gran numero di sferoidi tumorali 3D complessi dimensionalmente omogenei, potranno essere seminati in modalità che permettano un controllo architettonico delle colture 3D.

Questo progetto sarà implementato sfruttando cellule di diverse linee in possesso dei proponenti e scelte per simulare un ricco TME per il tumore del colon-retto. I proponenti hanno già esperienza di colture 3D di sferoidi e delle metodiche di caratterizzazione colturale, morfologica, molecolare e genetica necessaria a definire la validità dei modelli rispetto a tumori reali e alla loro evoluzione. Nelle prime fasi saranno sviluppate metodiche per ottenere sferoidi costituiti da due tipologie cellulari, miste o segregate, per poi affinare le metodiche e aumentare la numerosità delle tipologie cellulari impiegate insieme e ottenere veri e propri *tumoroidi*.

Poiché sempre nuove evidenze mostrano l'importanza delle proprietà meccaniche della matrice per lo sviluppo dei tumori e la risposta ai farmaci, il presente progetto propone di impiegare la tecnologia della microscopia a forza atomica per misurare le proprietà meccaniche di sferoidi/tumoroidi in crescita e poterli inserire in matrici dalle proprietà meccaniche opportune prima del trattamento farmacologico di test.

La nuova tecnologia si rivelerà utile a una vasta comunità di ricercatori, aziende CRO e industrie farmaceutiche interessate al ruolo del microambiente oncologico e allo sviluppo e allo screening di nuovi farmaci candidati o cocktail. Una opportuna diffusione di queste tipologie di tecniche per modelli tumorali avanzati in vitro porterà ad una sostituzione sempre più completa del modello animale (in particolare i PDX).

Il progetto sarà condotto in collaborazione fra i seguenti gruppi:

Prof. Dario de Biase (MED/04)

Dr. Giampaolo Zuccheri (CHIM/06)

Dr.ssa Fulvia Farabegoli (MED/04)

Dr. Renato Brandimarti (BIO/19)

Attività dell'assegnista e piano di formazione

L'assegnista sarà coinvolto e dovrà occuparsi di tutti gli aspetti pratici inerenti il progetto.

Preparazione dei tumoroidi da linee: ottenimento di colture 2D e 3D da singole linee e loro caratterizzazione morfologica, molecolare e genetica, seeding di sferoidi costituiti da due linee cellulari. Caratterizzazione morfologica/molecolare e tracciamento numerico/architetture delle componenti. Caratterizzazione genetica dei sistemi 2D e 3D con marcatori noti. Valutazione della deriva genica su risemina di generazioni di sferoidi. Generazione di sferoidi costituiti da più di due linee cellulari.

Test farmacologici (5-fluorouracile): test di riferimento sulle linee in coltura 2D e definizione dell'LD50; valutazione della risposta su monoculture 3D in micropozzetti. Valutazioni morfologiche, live-dead staining, conta di vitalità. Paragone con colture 2D. Valutazione della risposta su colture di sferoidi misti 3D in micropozzetti. Valutazioni morfologiche, live-dead staining, conta di vitalità. Paragone con sistemi 3D con una tipologia unica. Valutazione della deriva genica delle cellule esposte al trattamento: paragone 2D, 3D a tipologia singola, 3D a tipologie multiple.

Test di risposta alle diverse matrici: misura AFM su sistemi 3D costituiti di una sola linea cellulare; misura AFM su sistemi 3D costituiti da miscele diverse di diverse linee cellulari; caratterizzazione morfologica della crescita di sferoidi diversi in diverse matrici e correlazione dei risultati alle proprietà meccaniche degli sferoidi seminati

Dal punto di vista della formazione, l'assegnista sarà da me convocato mensilmente per riportare e discutere i dati ottenuti e programmare le attività delle settimane entranti. L'assegnista si occuperà anche della presentazione dei dati durante i lab meeting e della preparazione di poster, presentazioni orali e lavori scientifici inerenti al progetto. Inoltre, l'assegnista potrà partecipare a Conferenze nazionali o internazionali sugli argomenti di pertinenza del Progetto.

Bibliografia di riferimento essenziale

- Achilli et al. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*, Volume 12, Issue 10. 2012.
- Białkowska et al. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6225, 2020.
- Caleb et al. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.*, 06 March. 2020.
- Chanput et al. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* 23, 37–45. 2014.
- De Biase et al. Molecular Diagnostic of Solid Tumor Using a Next Generation Sequencing Custom-Designed Multi-Gene Panel. *Diagnostics*, 10, 250. 2020.
- Gunti et al. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers*, 13, 874. 2021.
- Hoarau-Vécho et al. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *J Int. J. Mol. Sci.* 19, 2018.
- Khawar et al. Three Dimensional Mixed-Cell Spheroids Mimic Stroma-Mediated Chemoresistance and Invasive Migration in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* (2018) 20, 800–812
- Lee et al. Generation of uniform-sized multicellular tumor spheroids using hydrogel microwells for advanced drug screening. *Sci Rep* 8, 17145, 2018.
- Li et al. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol Cancer* 18, 32. 2019.
- Magdeldin et al. Engineering a vascularised 3D in vitro model of cancer progression. *Sci Rep*, 7:44045 <https://doi.org/10.1038/srep44045>.
- Materassi D., Baschieri P., Tiribilli B., Zuccheri G., Samorì B. (2009) "An open source/real-time atomic force microscope architecture to perform customizable force spectroscopy experiments" *Review of Scientific Instruments* 80, 084301; doi:10.1063/1.3194046.
- Roma-Rodrigues et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 840. 2019.