

## Progetto di ricerca

### **Validazione di sistemi di colture primarie 3D di tumori solidi spontanei del cane come modello *in vitro* per lo studio dei fenotipi tumorali**

Le colture cellulari sono uno strumento chiave per valutare la potenziale efficacia di nuovi composti nel campo della ricerca farmacologica. Prove crescenti indicano che i sistemi di coltura cellulare 3D riproducono in modo più accurato il microambiente tissutale rispetto alle colture 2D. La spazialità delle colture 3D è cruciale per l'organizzazione spaziale dei recettori di superficie coinvolti nelle interazioni cellula-cellula (ad esempio, cellule neoplastiche e stromali), fornendo anche vincoli fisici alle cellule neoplastiche e pertanto mimando più strettamente le condizioni in vivo.

Lo scopo del progetto sarà quello di raccogliere campioni di neoplasie spontanee del cane, creare da essi colture cellulari primarie 3D e valutare comparativamente la ricchezza in cellule neoplastiche cresciute mediante confronto fra tumore primario e crescita 3D nell'espressione di marcatori specifici per la neoplasia in esame.

Verranno raccolti, da cani sottoposti a chirurgia presso strutture veterinarie, 20 campioni di ciascuno dei seguenti 4 tipi di tumore (osteosarcoma, emangiosarcoma splenico, melanoma mucosale e carcinoma uroteliale) e ne verrà valutato il fenotipo immunoistochimico di differenziazione (CD31 e FVIII-RA per gli emangiosarcomi, Vimentina, RUNX2 e ALP per gli osteosarcomi; Melan-A, S100 e PNL2 per i melanomi, PANcitocheratina e uroplachina per i carcinomi uroteliali).

Metodologicamente aliquote speculari dei campioni tumorali verranno utilizzate in parte per generare le colture 3D ed in parte fissate in formalina ed incluse in paraffina. Entrambe le matrici saranno sottoposte ad esame immunoistochimico per valutare l'espressione dei marcatori in analisi comparativa fra crescita 3D e tumore primario.

Gli obiettivi finali saranno la dimostrazione della ricchezza in cellule tumorali nella crescita 3D stimata mediante espressione degli stessi marcatori di differenziazione espressi nel corrispondente tumore primario.

### **Piano di Attività**

Allestimento di colture 3D. L'assegnista dovrà sviluppare sistemi ripetibili ed adattabili, se necessario con aggiustamenti differenziali, alle diverse tipologie di neoplasie da studiare. Andrà sviluppata una tecnologia che consenta di trattare la coltura 3D come un tessuto passibile di processazione istologica (fissazione in formalina e inclusione in paraffina). L'assegnista potrà contare di know how già presente presso il servizio di anatomia patologica del DIMEVET, ma dovrà sviluppare sistemi di crescita (quantitativo di cellule da caricare per la crescita, tampone di crescita, tempi di crescita) adattati alle diverse neoplasie da studiare. Questa attività sarà svolta presso il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (UNIBO), Unità di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata (via Belmeloro 8) e CRBA - Centro di Ricerca Biomedica Applicata - Via San Giacomo 14.

Indagine immunoistochimica sulle colture 3D. L'assegnista dovrà adattare i protocolli già in essere per indagini immunoistochimiche su tessuti da neoplasie primarie alle indagini immunoistochimiche da eseguire sulle colture 3D. Questa attività sarà svolta presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (UNIBO), servizio di anatomia patologica, via Tolara di Sopra 50, Ozzano Emilia.

Analisi comparativa. Impiego di analisi di immagine per stimare in maniera oggettiva e quantitativa l'analogia di espressione fenotipica di marcatori tra il tumore primario e la crescita 3D. Questa attività sarà svolta presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (UNIBO), servizio di anatomia patologica, via Tolara di Sopra 50, Ozzano Emilia.

## **Validation of primary 3D culture systems of canine solid spontaneous neoplasms as *in vitro* model for the study of tumour phenotypes**

Cell-based assays are key tools to assess the potential efficacy of new compounds in drug discovery assessment. Increasing evidence indicates that 3D cell culture systems reproduce more accurately tissue microenvironment compared to 2D cultures. The spatiality of 3D cultures is crucial for spatial organization of surface receptors involved in cell-to-cell interactions (e.g., neoplastic to stromal cells), providing also physical constraints to neoplastic cells thus, more closely mimicking *in vivo* conditions.

The aim of the project will be to collect samples of spontaneous canine tumors, create 3D primary cell cultures from them and comparatively evaluate the richness in tumor cells grown by comparing the primary tumor and 3D culture in the expression of specific markers.

From dogs undergoing surgery at veterinary facilities, 20 samples of each of the following 4 solid tumor types (osteosarcoma, splenic hemangiosarcoma, mucosal melanoma and urothelial carcinoma) will be collected and their immunohistochemical differentiation phenotypes will be evaluated (CD31 and FVIII-RA for hemangiosarcomas, Vimentin, RUNX2 and ALP for osteosarcomas; Melan-A, S100 and PNL2 for melanomas, PANcytokeratin and uroplakin for urothelial carcinomas).

Methodologically, specular aliquots of each tumor samples will be used partly to generate the 3D cultures and partly will be formalin fixed and paraffin embedded. Both matrices will undergo immunohistochemistry to evaluate in comparative analysis the expression of the markers in the 3D culture and primary tumor.

The final objectives will be the demonstration of the richness in tumor cells in the 3D growth estimated by the expression of the same differentiation markers in the corresponding primary tumor.

### **Training plan**

3D culture production. The research fellow will have to develop repeatable and adaptable systems, if necessary with differential conditions, to the different types of neoplasms. A technology will have to be developed that allows the 3D culture to be treated as a tissue usable for histological processing (formalin fixation and paraffin embedding). The research fellow will be able to rely on know-how already present at the pathological anatomy service of DIMEVET, but at the same time, the researcher will have to develop growth systems (quantity of cells to load for growth, growth buffer, growth times) suitable for the different neoplasms. This activity will be carried out at the Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (UNIBO), Unità di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata (via Belmeloro 8) and CRBA - Centro di Ricerca Biomedica Applicata - Via San Giacomo 14.

Immunohistochemical investigation of the 3D cultures. The research fellow will have to adapt to the 3D cultures the immunohistochemical protocols already in place for immunohistochemical investigations on primary tumors. This activity will be carried out at the Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (UNIBO), servizio di anatomia patologica, via Tolara di Sopra 50, Ozzano Emilia.

Comparative analysis. Use of image analysis to objectively and quantitatively estimate the similarity of the phenotypic expression markers between the primary tumor and the 3D culture. This activity will be carried out at the Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (UNIBO), servizio di anatomia patologica, via Tolara di Sopra 50, Ozzano Emilia.