

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**"FEDERICO II"**



**Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica**  
**XXIV ciclo**  
**Coordinatore Prof. Stefania Montagnani**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

*“Sviluppo di un sistema tridimensionale di coltura come modello preclinico di carcinoma del colon”*

**Relatore**

**Prof. Alessandro Arcucci**

**Dottoranda**

**Dott. Nunzia Amatruda**

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
VANTAGGI DEL 3D RISPETTO AL 2D.....	5
TECNICHE DI COLTURA IN 3D .....	9
IMPORTANZA DEL MICROAMBIENTE TUMORALE.....	11
INTERAZIONE TUMORE-STROMA E RUOLO DELLA COMPONENTE STROMALE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE .....	12
LE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI: RUOLO NELLA FORMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE .....	13
IL CARCINOMA DEL COLON .....	15
<b>SCOPO DELLA RICERCA .....</b>	<b>20</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>22</b>
COLTURE CELLULARI.....	22
GENERAZIONE DI SFEROIDI UTILIZZANDO IL METODO “HANGING DROPS” .....	23
OTTIMIZZAZIONE DEL METODO “HANGING DROPS”: “LID SYSTEM” .....	23
SISTEMA GRAVITYPLUS™ .....	24
STUDIO DELLA FORMAZIONE DELLO SFEROIDE MEDIANTE COLORAZIONE CON CFSE.....	26
IMMUNOISTOCIMICA (IHC) E COLORAZIONE CON EMATOSSILINA/EOSINA...	27
SAGGIO DI VITALITÀ/CITOTOSSICITÀ LIVE/DEAD®.....	29
IMMUNOFLUORESCENZA .....	30
ANALISI DI MARCATORI DI SUPERFICIE MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO .....	32
ESPRESSIONE GENICA .....	33
<b>RISULTATI .....</b>	<b>35</b>
ANALISI DELLA FORMAZIONE DELLO SFEROIDE .....	37
MORFOLOGIA .....	38
IMMUNOFLUORESCENZA .....	39
IPOSSIA .....	41
ESPRESSIONE DI MARCATORI DI SUPERFICIE .....	42
ESPRESSIONE GENICA .....	43
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>45</b>
<b>ICONOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni lo studio della biologia tumorale ha subito un progressivo sviluppo e molti aspetti fisiologici del microambiente tumorale sono stati chiariti, ma molto resta ancora da analizzare circa le modalità con cui il tumore interagisce con l'ambiente circostante e quali siano le caratteristiche molecolari di questo microambiente.

Un tumore è costituito, a livello macroscopico ed in una fase precoce, da un parenchima tumorale omotipico ed ancora ben differenziato, e da una componente cellulare non tumorale (fibroblasti e cellule del sistema immunitario), oltre che da una complessa rete di molecole disposte tridimensionalmente che formano la matrice extracellulare (ECM). Il complesso di cellule non parenchimali, oltre che la matrice molecolare extracellulare, è definito, nel suo insieme, stroma del tumore, e le scoperte degli ultimi anni gli attribuiscono importanti funzioni nello sviluppo e nella crescita del tumore stesso (Figura 1).

Lo studio delle patologie neoplastiche è stato condotto per anni principalmente su sistemi *in vitro* sviluppati in due dimensioni (2D): colture di cellule immortalizzate ed adese a supporti di varia natura, sono state usate nella speranza potessero mimare i ben più complessi sistemi tridimensionali di sviluppo tumorale *in vivo*.

Dal punto di vista tecnico, le colture cellulari bidimensionali riflettono solo parzialmente il pattern morfo-molecolare delle cellule tumorali umane ed inoltre non rispecchiano la complessità del microambiente *in vivo*. Nei sistemi *in vivo*, inoltre, lo sviluppo neoplastico differisce significativamente rispetto alle cellule coltivate in 2D, soprattutto per quanto riguarda la morfologia, la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il grado di differenziazione<sup>1</sup>.

In questo scenario, le colture cellulari tridimensionali (3D) costituiscono un approccio alternativo e/o parallelo al 2D, esse sono dunque il punto di legame tra la coltura cellulare tradizionale e i modelli *in vivo*<sup>2</sup>.

Per ricreare un tessuto umano sono necessari tre requisiti fondamentali:

- co-localizzazione di diversi tipi cellulari che interagiscono mutualmente mediante fattori di crescita, ormoni e molecole di adesione;
- produzione di matrice extracellulare che regola la funzionalità cellulare e funge da supporto meccanico del tessuto;
- sintesi di fluidi interstiziali che contengono i nutrienti ed i metaboliti necessari per la maturazione ed il differenziamento tissutale<sup>3</sup>.

Le cellule neoplastiche all'interno di un tessuto sono, infatti, organizzate in una complessa rete tridimensionale, stabilizzata da gradienti di nutrienti e meccanismi di trasduzione del segnale determinati dal contatto cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare.

I modelli generati grazie ai recenti sistemi di coltura tridimensionali possono soddisfare i suddetti requisiti ed essere quindi impiegati come modelli tumorali preclinici.

I modelli cellulari in 3D possono riprodurre in maniera accurata il microambiente tumorale e mimare i meccanismi regolatori che intercorrono tra tumore e stroma. Al momento essi vengono utilizzati in diversi studi per individuare il ruolo delle molecole di adesione nell'invasività/formazione di metastasi e nell'angiogenesi, e per l'analisi del rimodellamento tissutale<sup>3</sup>.

Le colture cellulari tridimensionali mostrano caratteristiche molecolari peculiari che si discostano, anche notevolmente, dalle colture in monostrato, ma che si avvicinano maggiormente all'architettura strutturale del tumore *in vivo*. In particolare, gli eventi iniziali della crescita del tumore, precedenti alla formazione di un'efficace vascolarizzazione, sembrano essere riprodotti in maniera più fedele nei sistemi tridimensionali. È stato riportato, inoltre, che le cellule tumorali epiteliali subiscono variazioni nella forma e nella polarità, tipicamente associati con la progressione tumorale *in vivo*<sup>1</sup>.

Attualmente, il modello 3D più diffuso è rappresentato da sferoidi tumorali multicellulari (MCTS), costituiti da cellule tumorali o da una co-coltura di cellule tumorali e stromali, che acquisiscono una simmetria sferica organizzata in assetto tridimensionale (Figura 2). Gli sferoidi vengono, generalmente, prodotti da linee cellulari stabilizzate che si aggregano in maniera

omotipica e presentano caratteristiche morfo-fisiologiche che favoriscono le complesse interazioni cellula-cellula e cellula-matrice<sup>4</sup>. Tali caratteristiche li rendono paragonabili a regioni tumorali avascolari e/o a micro metastasi *in vivo*.

In genere i piccoli tumori *in vivo* mostrano una maggiore resistenza alla terapia rispetto alle cellule tumorali coltivate in monostrato. La complessa architettura del tumore solido causa infatti la cosiddetta “resistenza multicellulare” (multicellular resistance, MCR), un fenomeno determinato da diversi meccanismi cellulari: la stratificazione in uno strato esterno proliferativo, uno strato intermedio quiescente ed un *core* ipossico e necrotico; la ridotta permeabilità ai farmaci; l’inibizione dell’apoptosi e la modulazione dell’espressione di proteine chiave come gli enzimi di riparazione del DNA o le topoisomerasi<sup>5</sup>.

Le cellule tumorali all’interno dello sferoide riproducono la stessa disposizione concentrica ed, allo stesso tempo, hanno un *pattern* di crescita simile ai tumori solidi nello stadio iniziale non vascolarizzato<sup>6</sup>. Queste caratteristiche fanno degli sferoidi tumorali multicellulari un sistema più vicino alla struttura tumorale *in vivo* e li rendono un’ottima alternativa per lo studio dei diversi tumori. Grazie alle loro peculiarità, gli sferoidi sono utilizzati per valutare l’alterazione dell’espressione genica delle cellule tumorali durante lo sviluppo neoplastico e per testare l’effetto di radiazioni o la sensibilità a nuovi agenti chemioterapici specifici per i differenti tumori.

### ***VANTAGGI DEL 3D RISPETTO AL 2D***

La crescita e il mantenimento di un tessuto umano dipendono da fattori essenziali, quali le interazioni tra diversi tipi cellulari attraverso fattori di crescita, ormoni e molecole di adesione, una complessa matrice extracellulare che dia supporto meccanico e regoli le funzioni cellulari, e la sintesi di nutrienti ed effettori biologici che possano sostenere il differenziamento e la maturazione tissutale.

I modelli *in vitro* bidimensionali pur essendo ampiamente utilizzati sono limitanti per lo studio della fisiologia cellulare e della tumorigenesi<sup>3</sup>.

Le colture cellulari in 2D sono sistemi semplici ed economici e permettono di conservare un buon tasso di sopravvivenza delle cellule in coltura, tuttavia non sono in grado di ricostruire il microambiente tissutale, a causa della mancanza dello stroma che fornisce un supporto strutturale all'architettura cellulare. La mancanza dello stroma è un fattore altamente limitante se si considera che, in determinati tumori, lo stroma è fondamentale per il rimodellamento tissutale; ad esempio, nel caso del cancro della mammella, più dell'80% del volume della ghiandola mammaria è formato da stroma<sup>7</sup>. Studi recenti indicano infatti che lo stroma tumorale supporta in maniera critica la crescita del tumore, la risposta ai farmaci, la progressione e la formazione di metastasi<sup>8</sup>. Cellule epiteliali coltivate in monostrato su supporti artificiali, inoltre, presentano la perdita di peculiari caratteristiche cellulari, come la polarità, perché direttamente influenzate dalle proprietà chimico-fisiche del supporto.

I modelli cellulari tridimensionali assumono, invece, una reale architettura cellulare e presentano un profilo di espressione genica che riflette un fenotipo differenziativo.

L'utilizzo di sferoidi uni-cellulari e multi-cellulari si è rivelato un sistema efficiente per ottimizzare e superare le limitazioni legate ai sistemi convenzionali *in vitro*.

Il modello dello sferoide è stato introdotto dai radio-biologi nel 1970<sup>9</sup>. Ad oggi l'utilizzo del termine sferoide, sfera, organoide o tumoroido è spesso controverso in letteratura. Il termine "aggregato" invece è usato per descrivere ed eventualmente discriminare cellule impacchettate meno saldamente da colture sferiche compatte<sup>10</sup>. Sfortunatamente quelli che in letteratura vengono chiamati sferoidi spesso non sono altro che aggregati che non presentano una reale geometria sferica, difficilmente manipolabili, mancanti delle interazioni cellulari.

Una struttura 3D ben definita e l'uniformità geometrica sono requisiti indispensabili per la generazione di colture cellulari efficienti e per la realizzazione di un modello da introdurre nei "drug tests"<sup>11</sup>.

Lo sferoide è costituito da cellule proliferanti nello strato periferico, che rispecchiano l'attivo turn-over delle cellule tumorali vicino ai capillari, e da cellule degli strati più interni che diventano, invece, quiescenti ed eventualmente muoiono, via apoptosi o necrosi, a causa della presenza di ipossia, man mano che il diametro dello sferoide aumenta<sup>12</sup>.

Al di sopra di 400-500µm di diametro si forma, infatti, un *core* necrotico, principalmente a causa della limitata diffusione di ossigeno e/o di nutrienti e all'accumulo di cataboliti e tossine<sup>13</sup> (Figura 2).

Studi basati sull'analisi dei livelli di glucosio, di lattato e l'attività mitocondriale negli sferoidi indicano un adattamento del metabolismo allo stress ambientale nella regione interna dello sferoide, che mantiene l'omeostasi cellulare per un breve periodo fino al sopraggiungere della morte cellulare<sup>14</sup>.

Gli sferoidi multicellulari possono contenere un'estesa matrice extracellulare che determina quella rete di connessioni cellula-cellula e cellula-matrice responsabile non solo della penetrazione e dell'azione dei farmaci, ma che influisce anche sulla distribuzione e funzione di effettori biologici, come ormoni e fattori di crescita, che regolano i meccanismi di crescita, differenziamento e morte cellulare.

La mancanza di un sistema vascolare che perfonda il tessuto, anche se, in parte sopperita, dalla diffusione semplice di ossigeno, nutrienti e cataboliti, risulta un punto debole delle colture in 3D. All'aumentare delle dimensioni dello sferoide, infatti, la diffusione di ossigeno e nutrienti, oltre che la rimozione dei cataboliti cellulari, diventa sistematicamente più complessa e può fortemente influenzare la fisiologia cellulare ed introdurre nuove variabili in un sistema di analisi.

Tuttavia, nello studio di alcune tipologie neoplastiche, come ad esempio il carcinoma del colon, tale caratteristica potrebbe rappresentare un punto a favore più che un ostacolo, dal momento che la normale fisiologia del carcinoma del colon prevede la presenza di aree di tessuto altamente ipossiche e di tessuto necrotico. Un sistema capace di mimare, non solo le interazioni intercellulari, ma anche le condizioni chimico-fisiche presenti nei tumori *in vivo*, potrebbe

rivelarsi un'arma vincente nello studio della patologia e un mezzo estremamente utile per testare farmaci chemioterapici.

Mellor et al, ad esempio, hanno comparato l'effetto di alcuni farmaci come il 5-fluorouracile, il cis-platino e la doxorubicina in sferoidi proliferanti e quiescenti di cellule di adenocarcinoma del colon DLD-1. In base all'analisi della crescita volumetrica degli sferoidi e della sopravvivenza cellulare, hanno riscontrato che i farmaci testati hanno diversa efficacia terapeutica e, soprattutto, l'efficacia di uno stesso farmaco varia in base allo stato di proliferazione dello sferoide<sup>15</sup>.

Generalmente la risposta al trattamento farmacologico può essere influenzata da una moltitudine di fattori, che includono: le barriere di penetrazione, l'alterazione dell'espressione genica, la modulazione dei sistemi di riparazione del DNA e la distribuzione di segnali di sopravvivenza e del ciclo cellulare<sup>11</sup>. Per valutare l'efficacia terapeutica di un farmaco risulta importante la scelta del diametro dello sferoide da utilizzare come sistema sperimentale di analisi, al fine di monitorare la capacità di penetrazione di un farmaco o la sua distribuzione all'interno del tessuto.

I test di screening di farmaci potenzialmente rilevanti nella terapia anti cancro si basano sulla capacità che essi hanno di uccidere o inibire la proliferazione di 60 linee cellulari stabilizzate da diversi tumori, coltivate in 2D, inserite nella lista certificata dal National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program (NCI-DTP)<sup>16</sup>.

Questo programma informativo è stato formulato più di venti anni fa, ed ha fornito alla comunità scientifica una serie standardizzata di modelli cellulari ampiamente disponibili, da impiegare in studi ad alto rendimento per l'analisi dei meccanismi d'azione di farmaci specifici. Tuttavia queste "linee guida" sono risultate poco efficienti per l'identificazione di farmaci clinicamente efficaci. La maggior parte dei nuovi agenti antitumorali, identificati attraverso il metodo di screening *in vitro* appena descritto, si sono rivelati inefficaci contro i tumori *in vivo*<sup>17</sup>. Il punto debole di tale procedura è infatti, proprio il limitato valore predittivo rispetto ai modelli *in vivo* ed i sistemi di coltura in 3D per la valutazione dell'efficacia terapeutica, potrebbero in parte sopperire all'inefficienza dei test preclinici precedentemente evidenziati.



## ***TECNICHE DI COLTURA IN 3D***

Nonostante negli ultimi anni siano state descritte diverse tecniche per la generazione e la coltura di sferoidi tumorali, al momento non esiste una procedura standard di riferimento.

Gli sferoidi possono essere ottenuti con diverse tecniche finalizzate all'aggregazione delle cellule attraverso la promozione dell'adesione cellulare, evitando l'interazione cellula-superficie di contatto<sup>18</sup>. Una strategia introdotta ormai da decenni ma ancora diffusa prevede l'impiego di una continua agitazione della sospensione cellulare all'interno di "*spinner flasks*", in tal modo si formano spontaneamente aggregati sferici e si previene l'adesione ad altri substrati. Un sistema simile alle colture in "*spinner flasks*" utilizza agitatori circolari o tubi rotanti, che mantengono le cellule in sospensione tra le pareti cilindriche rotanti grazie alla microgravità<sup>19</sup>. Entrambi i metodi permettono di ottenere un numero elevato di sferoidi di dimensioni eterogenee e, per questo, sono adatti per la produzione su larga scala. Tali tecniche richiedono grandi quantità di terreno di coltura e la disponibilità di attrezzature specifiche.

Le tecniche di coltura stazionarie sono più semplici e prevedono l'apposizione della sospensione cellulare su una superficie non aderente, vengono spesso utilizzate piastre rivestite con matrici organiche come agar, poly-HEMA, Matrigel o collagene<sup>20</sup>.

L'utilizzo di piastre da 96 pozzetti con fondo ad U rivestite con agar, permette l'aggregazione cellulare mediante sedimentazione sulla superficie concava del pozzetto ed è in seguito possibile monitorare e manipolare gli sferoidi separatamente. La variazione del diametro all'interno della piastra si mantiene al di sotto del 5% per diversi tipi di sferoidi e rimane relativamente bassa quando il medium di coltura viene periodicamente cambiato<sup>12</sup>.

Questi metodi permettono la formazione di sferoidi di dimensioni omogenee e consentono l'analisi dei singoli sferoidi, ma richiedono un'accurata manipolazione e sono limitati ad una limitata produzione degli stessi.

Una tecnica alternativa è il metodo "hanging drops" (gocce sospese)<sup>5,21</sup>, che rappresenta una valida variante per la produzione di sferoidi, in quanto è un metodo semplice, che può essere utilizzato con diverse linee cellulari e permette la produzione di sferoidi di dimensioni omogenee e compatti. Il metodo di coltura con *hanging drops* viene comunemente utilizzato per indurre la formazione di corpi embrioidi da cellule staminali embrionali<sup>22</sup>. Il fondo arrotondato della goccia sospesa facilita l'aggregazione delle cellule, inoltre è possibile modificare la dimensione dello sferoide che si viene a formare semplicemente variando il numero di cellule nella sospensione cellulare. Il metodo prevede la deposizione di un piccolo volume di cellule (20-40µl) nel coperchio di una piastra petri oppure di una piastra a 96 pozzetti. Invertendo la piastra si forma una goccia "pendente" e le cellule, per gravità, si accumulano nel fondo della goccia, tendendo quindi ad aggregarsi in sferoidi. Per evitare l'evaporazione della goccia, il fondo della piastra viene riempito con PBS<sup>23</sup>. Tale tecnica ha il vantaggio di poter formare singoli sferoidi di dimensione uniforme, non necessita l'utilizzo di piastre rivestite ed inoltre non richiede particolari attrezzature. Tuttavia non mancano gli svantaggi: comporta un intenso lavoro manuale per la raccolta dei singoli sferoidi, il volume della goccia sospesa deve essere al di sotto dei 50µl, in tal modo la tensione superficiale è sufficiente alla ritenzione della goccia, il cambio del terreno di coltura è praticamente impossibile e, per questo motivo, è utile solo per colture a breve termine. Non è quindi una tecnica finalizzata alla produzione su larga scala né per uno studio a lungo termine.

I metodi automatizzati introdotti negli ultimi anni sono invece finalizzati ad una produzione più ampia di sferoidi tumorali da utilizzare per screening preclinici. L'ingegneria tissutale ha risolto alcuni problemi delle tecniche tradizionali, servendosi di *scaffolds* e bioreattori. Lo sviluppo di nuovi biomateriali ha permesso di avere una considerevole disponibilità di *scaffolds* con materiali biocompatibili che hanno proprietà chimiche, meccaniche e biologiche ben definite. Tuttavia non contengono intrinsecamente le molecole segnale necessarie per ricreare il microambiente cellulare, che invece sono associate con i gel naturali di collagene o Matrigel<sup>19</sup>. L'uso dei bioreattori ha invece permesso di provvedere ai bisogni metabolici di un tessuto

vascolarizzato<sup>24</sup>. Il tumore è infatti una struttura vascolarizzata che deve reclutare vasi sanguigni per ottenere l'ossigeno e i nutrienti necessari per sostenere una rapida crescita.

La perfusione di fluidi all'interno del bioreattore garantisce un continuo gradiente esterno e/o interno di nutrienti che ricrea la natura irregolare della micro-vascolatura tumorale *in vivo*.

Questi sistemi tuttavia non hanno ancora trovato un'applicazione di routine nella validazione o nella scoperta di nuovi farmaci, principalmente per la mancanza di una tecnica ben standardizzata su larga scala e testata, mediante l'applicazione di diversi sistemi analitici sui differenti tumori.

La necessità dunque di un metodo di coltura standard, che dia origine a sferoidi omogenei in dimensione, forma e distribuzione cellulare, utilizzabile anche per colture a lungo termine e con cellule da diverse tipologie di tumori ed analizzabili con differenti tecniche analitiche è ormai evidente ai fini di un'ottimale validazione di terapie farmacologiche anti-cancro.

### ***IMPORTANZA DEL MICROAMBIENTE TUMORALE***

Il microambiente tumorale gioca un ruolo cruciale nel differenziamento cellulare ed incide sull'efficienza terapeutica. Gli sferoidi tumorali multicellulari sono risultati un sistema valido da paragonare alla fisiologia del tumore *in vivo*<sup>11</sup>. Tuttavia è evidente che la struttura degli sferoidi in monocultura non rispecchia pienamente l'eterogeneità cellulare che invece è presente in un tessuto tumorale.

Sono stati sviluppati diversi sistemi in co-culture basati sull'utilizzo di sferoidi. I tipi cellulari più frequentemente utilizzati sono cellule tumorali, cellule immunitarie, fibroblasti e cellule endoteliali. In genere le cellule immunitarie sono aggiunte in sospensione a sferoidi preformati, le cellule endoteliali ed i fibroblasti vengono invece aggiunti sia in sospensione, insieme alle cellule tumorali o aggiunti a sferoidi tumorali preformati, sia in monostrato, usati come supporto su cui coltivare gli sferoidi tumorali; infine è possibile coltivare sferoidi preformati di due tipi

cellulari differenti<sup>12</sup>. Molti di questi modelli utilizzano un diverso tipo cellulare per indurre o mantenere il differenziamento del tipo cellulare di interesse<sup>25</sup>. E' infatti importante tenere in considerazione che il comportamento di una cellula tumorale, il suo stato differenziativo e le sue peculiarità in generale, dipendono non solo da caratteristiche intrinseche, ma soprattutto dal microambiente che la circonda e dalle interazioni con le tipologie cellulari circostanti. In particolare le cellule stromali sono tra gli attori principali nel mediare la crescita cellulare, il differenziamento e la resistenza all'apoptosi.

Dati recenti indicano che le cellule stromali mesenchimali (MSC) agiscono da promotori della progressione tumorale e del potenziale metastatico<sup>8</sup>. È stato infatti dimostrato che cellule stromali mesenchimali derivate dal midollo osseo (BM-MS), co-coltivate in 2D con linee cellulari stabilizzate di cancro del colon-retto, favoriscono la proliferazione delle cellule tumorali, ne riducono la capacità adesiva, incrementando il potenziale invasivo, inducono l'attivazione della transizione epitelio-mesenchimale e promuovono la tumorigenicità *in vivo* favorendo la formazione vascolare<sup>47</sup>.

### ***INTERAZIONE TUMORE-STROMA E RUOLO DELLA COMPONENTE STROMALE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE***

Un evento fondamentale nella formazione e progressione del tumore è rappresentato dalla formazione di un peculiare microambiente tumorale, ed in particolare, dall'interazione delle cellule tumorali che compongono il carcinoma invasivo e la sua componente stromale. Le cellule tumorali stimolano la formazione de novo del tessuto connettivo, al fine di fornire un supporto stromale per lo sviluppo del tumore<sup>26, 27</sup>. La componente stromale consiste di matrice extracellulare, di cellule stromali di origine mesenchimale (MSCs), di fibroblasti di varia tipologia, di cellule immunitarie ed infiammatorie, di cellule endoteliali e precursori endoteliali, vasi sanguigni e linfatici e nervi<sup>28</sup>(Figura 1).

È ben noto il contributo attivo delle cellule stromali tumore-associate nella progressione tumorale<sup>26</sup>. Numerosi studi in colture cellulari e in modelli di xenotrapianto hanno infatti fornito evidenza che le MSCs sono reclutate nel sito tumorale, così come accade durante i processi di guarigione delle ferite e di sviluppo di cicatrice<sup>29</sup>. L'interazione paracrina tra cellule stromali ed epiteliali promuove la proliferazione, la capacità invasiva, la tumorigenicità e il potenziale metastatico di cellule tumorali o epiteliali<sup>26, 28, 30</sup>.

I meccanismi responsabili di questi fenomeni rimangono però in gran parte da chiarire.

In modo simile alle MSCs, anche i fibroblasti carcinoma-associati (CAFs o tumore-associati TAFs), attraverso la secrezione di fattori di crescita e chemochine, inducono un'alterazione della matrice extracellulare (ECM) e forniscono ulteriori segnali oncogenici tali da favorire la proliferazione e l'invasione delle cellule tumorali<sup>30</sup>. Le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare sono fondamentali durante l'oncogenesi: la caratterizzazione delle proteine associate alla trasformazione maligna è essenziale per comprenderne i meccanismi e per individuare potenziali target per la scoperta precoce del tumore<sup>30</sup>. Cambiamenti nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice possono dar luogo a segnali di allarme che hanno effetto sull'espressione genica e sui comportamenti delle cellule tumorali, come proliferazione, sopravvivenza, differenziamento e motilità<sup>28</sup>.

### ***LE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI: RUOLO NELLA FORMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE***

Il concetto di cellula mesenchimale o stromale fu originariamente proposto più di 100 anni fa da Cohnheim<sup>31</sup>.

Il termine "stroma" deriva dal greco στρωμα (materasso; predisposto per seduta), ed è usato per indicare il tessuto connettivo associato al tessuto funzionale dominante, o parenchima, in un determinato organo<sup>32</sup>.

Nel contesto del midollo osseo dei mammiferi (*bone marrow* o BM), il termine stroma si riferisce ad elementi del tessuto connettivo non-ematopoietici che forniscono un sistema di supporto strutturale e funzionale per il processo emopoietico. Infatti, contribuendo alla formazione di un microambiente che promuove le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (ECM), le BM-MSCs supportano la proliferazione, il differenziamento e la maturazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) nei diversi tipi cellulari di cui è composto il sistema ematopoietico<sup>33</sup>. La composizione cellulare del tessuto stromale è molto complessa e comprende una popolazione eterogenea di cellule, tra cui le cellule reticolari, adipociti, le cellule osteogeniche, cellule vascolari endoteliali, cellule muscolari lisce nelle pareti del vaso, e macrofagi<sup>33</sup>.

Piccole nicchie sono distribuite nei vari tessuti, come riserva per la riparazione delle ferite e per la formazione di cicatrici. Inoltre, piccole quantità di MSCs sono presenti nella circolazione sanguigna in modo da poter essere reclutate verso siti danneggiati<sup>34</sup>. Quando si verifica un danno tissutale, specifici segnali endocrini vengono rilasciati dal sito che mobilitano le MSCs dal midollo osseo verso la posizione del danno tissutale<sup>29, 34</sup>. Le MSCs sono in grado di riparare i danni tissutali mediante differenziamento, fusione cellulare o mediante secrezione di citochine e fattori di crescita.

Le MSCs contribuiscono anche al mantenimento e alla rigenerazione di varie tipologie di tessuto connettivo, come osso, cartilagine, tessuto adiposo e muscolare. Per questo motivo, spesso vengono definite “cellule mesenchimali staminali”; la definizione di “staminale” è basata sulla dimostrazione che esiste una popolazione clonogenica di cellule umane derivate da midollo osseo che possiedono capacità di differenziare in almeno tre ben definiti *lineage* mesenchimali (osteociti, adipociti e condrociti), se coltivati in appropriate condizioni differenziative<sup>35</sup>.

Le MSCs sono recentemente diventate un argomento di grande interesse in oncologia per la loro capacità di *homing* o di reclutamento ai siti tumorali. Diversi studi hanno infatti dimostrato che in maniera simile a quello che accade nei siti danneggiati, lo sviluppo di tumori recluta le MSCs attraverso la secrezione di segnali endocrini e paracrini<sup>32</sup>. Questo offrirebbe la possibilità di

utilizzare le MSCs come vettori per il rilascio di farmaci anti-tumorali direttamente nel sito del tumore.

## ***IL CARCINOMA DEL COLON***

Il **cancri del colon** occupa il secondo posto per mortalità tumorale nell'uomo e il terzo nella donna<sup>36</sup>. È più frequente in Nord America, Europa occidentale e Nuova Zelanda. In Italia si osservano 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti, di cui la maggior incidenza si colloca tra la quinta e la settima decade di vita. L'80% dei casi di CRC (ColoRectal Cancer) è rappresentato dalle forme sporadiche, non connesse con mutazioni geneticamente acquisite. Mentre il cancro del colon colpisce indifferentemente entrambi i sessi, per il cancro del retto si ha un rapporto maschi:femmine di circa 2:1. Nelle ultime due decadi si è assistito ad un progressivo aumento dell'insorgenza di CRC; tuttavia, grazie alla diagnosi precoce e all'evoluzione delle terapie, la sopravvivenza a 5 anni è notevolmente aumentata<sup>37</sup>. Le sedi maggiormente colpite sono il retto (39%) e il sigma (25%), senza però risparmiare nessun distretto colo-rettale. I fattori e le condizioni di rischio possono essere:

- **Età:** l'incidenza di CRC aumenta con l'età del soggetto. Raramente colpisce soggetti con età inferiore ai 50 anni. Casi di CRC in giovani adulti sono associati a condizioni di predisposizione familiare.
- **Familiarità:** presenza di parenti di 1° e 2° grado con poliposi adenomatosa familiare (**FAP**) o con cancro coloretale ereditario non poliposico (**HPNCC**) aumenta il rischio di contrarre CRC.
- **Fumo:** i soggetti fumatori hanno una maggiore probabilità di morire per esiti di CRC rispetto ai soggetti non fumatori. Uno studio della *American Cancer Society* riporta che “donne fumatrici hanno una maggiore probabilità (40%) di morire per CRC rispetto alle

donne non fumatrici”. Analogamente, “uomini fumatori hanno una maggiore probabilità (30%) di morire per CRC rispetto a uomini non fumatori”.

- **Dieta:** l'alto contenuto di grassi e proteine nel regime alimentare aumenta l'insorgenza di CRC, in relazione al potere cancerogeno dei cataboliti proteici e del colesterolo. Altri studi confermano l'importanza del consumo di fibre e frutta come fattore di protezione<sup>38</sup>. In particolare, le vitamine e gli antiossidanti della frutta, come la vitamina C, sono in grado di proteggere le cellule coliche dallo stress ossidativo.
- **Fattori ambientali:** soggetti residenti in aree industrializzate hanno un rischio maggiore per lo sviluppo di CRC<sup>36</sup>.
- Presenza di **processi infiammatori cronici dell'intestino**, come il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa<sup>39</sup>. Circa l'1% dei pazienti con CRC ha una storia clinica di rettocolite ulcerosa. Il rischio di sviluppare CRC è direttamente connesso con la gravità del danno della mucosa intestinale e con l'estensione del processo infiammatorio. Il rischio di sviluppare CRC nei soggetti con il morbo di Crohn è minore rispetto ai soggetti con rettocolite ulcerosa<sup>40</sup>.
- **Ormoni:** le differenze in merito all'incidenza e all'età di insorgenza tra maschi e femmine possono essere attribuite al diverso pattern ormonale tra i due sessi; in particolare, l'accento è stato posto sugli estrogeni. La presenza di dati contrastanti, rende questi studi ancora poco affidabili. Infatti, è stato riportato un aumento dell'insorgenza di CRC in donne sottoposte a terapia sostitutiva per gli estrogeni (tamoxifene), risultato in contrasto con l'ipotetico ruolo protettivo degli ormoni femminili.
- **Presenza di polipi del colon:**
  - Nei polipi isolati possono essere presenti aree di accertata malignità. Viceversa, nelle lesioni localizzate del carcinoma del colon-retto sono spesso presenti aree adenomatose riconducibili a precedenti formazioni polipoidi<sup>37</sup>.
  - La sede di insorgenza dei polipi è spesso sede di insorgenza di CRC.



- I soggetti con polipi hanno maggiore probabilità di sviluppare CRC rispetto ai soggetti sani.
- Maggiori sono i polipi diagnosticati nel soggetto, maggiore è la probabilità di sviluppare CRC.
- La polipectomia riduce l'insorgenza di CRC.

Un polipo può svilupparsi dalla mucosa sana in circa 5 anni; tuttavia, affinché la lesione polipoide possa trasformarsi in carcinoma in situ (CIS) occorrono circa 2 anni. Sono necessari altri 3 anni per sviluppare un carcinoma invasivo. Esistono diversi istotipi: adenoma tubulare (75%), adenoma tubulo-villoso (5%) e adenoma villosa (20%). L'importanza dei polipi è giustificata dalla capacità di trasformazione neoplastica in relazione ad alcune loro proprietà:

- **Morfologia.** I polipi sessili (larga base di impianto) hanno una maggiore capacità trasformante rispetto ai polipi peduncolati.
- **Istotipo.** L'istotipo ad adenoma tubulare evolve verso carcinoma più frequentemente rispetto all'adenoma villosa.
- **Diametro.** I polipi con un diametro maggiore di 2 cm evolvono più frequentemente a CIS rispetto a quelli di dimensioni inferiori.
- **Sede.** I polipi localizzati in sede prossimale (colon ascendente e flessura epato-colica) evolvono più frequentemente verso il CIS rispetto a quelli localizzati in sede distale.
- **Numero.** Maggiore è il numero di polipi, più elevato è il rischio di sviluppare CIS.

I tumori del colon-retto possono presentarsi in forma vegetante (protrudono nel canale intestinale, come i polipi), ulcerati (frequente), infiltranti la mucosa (margini netti e poco rilevati, rari) e anulare stenotico (come un anello intorno alla mucosa intestinale). La classificazione dell'OMS suggerisce la suddivisione in tumori epiteliali, carcinoidi, non epiteliali e del sistema emopoietico. Il tipo più diffuso è l'adenocarcinoma (95%). Il cancro del colon-retto mostra un classico esempio di patogenesi multisteps<sup>36</sup>, questo significa che affinché si possano accumulare le mutazioni necessarie alla genesi del carcinoma invasivo occorrono diversi *steps*, intesi come

eventi patologici caratterizzati dall'acquisizione di funzione di un proto-oncogene o dalla perdita di funzione di un gene oncosoppressore. La prognosi nei soggetti con cancro del colon-retto dipende strettamente dal grado di invasione tissutale locale, dall'infiltrazione degli organi vicini e dalla presenza di metastasi linfonodali o ad altri organi. Si possono utilizzare diversi sistemi di stadiazione, che correlano strettamente con il profilo prognostico e la sopravvivenza a 5 anni. La classificazione di Dukes, proposta dal dottor Cuthbert E. Dukes nel 1932, pone l'accento sulla infiltrazione tissutale, sul coinvolgimento linfonodale e sulla presenza di metastasi a distanza (Figura 3). Gli stadi del tumore sono identificati come:

- A – Tumore confinato alla parete intestinale
- B – Tumore che invade la parete intestinale
- C – Con coinvolgimento linfonodale (suddiviso in C1 dove l'apice nodale non è coinvolto e C2 dove l'apice del linfonodo è coinvolto)
- D – Con metastasi distali

La classificazione TNM (tumors/nodes/metastases), creata dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC), più attuale e maggiormente usata, pone maggiore attenzione al grado di infiltrazione tissutale, discriminando tra l'invasione della sola mucosa, dello strato muscolare o della sierosa. "T" denota il grado di invasione della parete intestinale, "N" il grado di coinvolgimento del nodo linfatico e "M" il grado di metastasi. Gli stadi del cancro sono di solito citati come I, II, III, IV, derivati dal valore TNM raggruppati per la prognosi, un numero più elevato indica un tumore più avanzato e un probabile esito peggiore.

AJCC stage	TNM stage	TNM stage criteria for colorectal cancer
Stage 0	Tis N0 M0	Tis: Tumor confined to mucosa; cancer- <i>in-situ</i>
Stage I	T1 N0 M0	T1: Tumor invades sub mucosa
Stage II-B	T2 N0 M0	T2: Tumor invades muscularis propria

Stage II-A	T3 N0 M0	T3: Tumor invades subserosa or beyond (without other organs involved)
Stage II-B	T4 N0 M0	T4: Tumor invades adjacent organs or perforates the visceral peritoneum
Stage III-A	T1-2 N1 M0	N1: Metastasis to 1 to 3 regional lymph nodes. T1 or T2.
Stage III-B	T3-4 N1 M0	N1: Metastasis to 1 to 3 regional lymph nodes. T3 or T4.
Stage III-C	any T, N2 M0	N2: Metastasis to 4 or more regional lymph nodes. Any T.
Stage IV	any T, any N, M1	M1: Distant metastases present. Any T, any N.

Numerosi recenti studi hanno identificato nuovi marcatori di elevato significato prognostico, che potrebbero permettere una migliore stratificazione diagnostica soprattutto per i pazienti in stadio II e III, con conseguente migliore definizione dell'indicazione clinica per eventuali terapie.

## SCOPO DELLA RICERCA

Le colture cellulari bidimensionali rispecchiano solo parzialmente le peculiarità, il pattern morfo-molecolare delle cellule tumorali e soprattutto la complessità del microambiente *in vivo*. Il comportamento e le caratteristiche delle cellule tumorali differiscono significativamente durante lo sviluppo del tumore nei sistemi *in vivo* rispetto alle colture in 2D, soprattutto per quanto riguarda la morfologia, la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il grado di differenziazione.

I modelli cellulari in 3D, invece, possono riprodurre il comportamento invasivo delle cellule tumorali umane, mimare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare e ricreare il microambiente ideale per i meccanismi regolatori che intercorrono tra tumore e componente stromale.

In questo scenario, la creazione di sferoidi tumorali multicellulari è risultato un sistema valido per mimare la fisiologia del tumore *in vivo*. Tuttavia è evidente che la struttura degli sferoidi in monocultura non rispecchia pienamente l'eterogeneità cellulare che invece è presente in un tessuto tumorale. Il microambiente tumorale, infatti, gioca un ruolo cruciale nel differenziamento cellulare, nello sviluppo tumorale ed incide sull'efficienza terapeutica. È ormai ben noto che in particolare lo stroma tumore-associato svolge un ruolo attivo nella cancerogenesi, nella vascolarizzazione e nella metastatizzazione di molte tipologie di carcinomi, tra cui il carcinoma del colon-retto (CRC). Le colture 3D permettono dunque di ricreare il microambiente tumorale attraverso la co-cultura con diverse popolazioni cellulari, tra cui cellule endoteliali, fibroblasti, cellule stromali.

Alcune linee cellulari di cancro del colon, sono capaci di formare sferoidi quando coltivate in condizioni di non-aderenza, ed è stato dimostrato che questi sferoidi rispecchiano maggiormente la patofisiologia dei tumori rispetto alle corrispondenti linee cellulari coltivate in monostrato, per

questo può diventare fondamentale la loro applicazione per studi di chemio- e radio-resistenza o per la validazione di nuovi farmaci chemioterapici.

Nonostante in letteratura siano riportati diversi studi che illustrano l'ampia applicazione degli sferoidi come modelli preclinici per il conseguimento di una maggiore efficacia terapeutica, la difficoltà nella diffusione delle colture di sferoidi in 3D è dovuta alla mancanza di una tecnica ben standardizzata.

Al fine di creare un avanzato sistema 3D per la coltura di cellule del cancro del colon-retto *in vitro*, abbiamo comparato diversi metodi di coltura basati sulla tecnica “*hanging drops*”, cercando di ottimizzarli fino ad ottenere quello più efficiente per le nostre necessità e che mantenesse dimensioni e fenotipo costanti ed omogenee. Abbiamo inoltre valutato l'impatto di tali tecniche su linee cellulari di CRC inserite nel pannello di 60 linee cellulari del NCI, comparando fenotipo ed espressione genica delle colture in 3D rispetto alle tecniche di coltura tradizionali. Inoltre abbiamo analizzato il contributo della componente stromale sulla formazione e crescita degli sferoidi, utilizzando BM-MSM in co-coltura tridimensionale con le linee cellulari di CRC.

# MATERIALI E METODI

## *COLTURE CELLULARI*

E' stata utilizzata una linea cellulare umana stabilizzata di CRC, HT29. La linea cellulare HT29 è stata coltivata in medium McCoy's 5A (SIGMA) addizionato con 10% FCS (Fetal Calf Serum), 1% Glutammato e 1% Kanamicina.

MSCs da midollo osseo di donatori sani sono state coltivate in  $\alpha$ -MEM (GIBCO) addizionato con 10% FCS, 1% HEPES, 1% Sodio Piruvato, 1% Kanamicina, 5 ng/mL FGF-2<sup>41</sup>

Le cellule sono state coltivate in incubatore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato cambiato due volte la settimana e la morfologia di entrambe le linee cellulari è stata analizzata periodicamente al microscopio in contrasto di fase. Una volta raggiunta una confluenza dell'80% le cellule sono state lavate con PBS e tripsinizzate con TrypLE™ Express (GIBCO), centrifugate per 5 minuti a 1500rpm, contate con emocitometro di Neubauer (Neubauer Manufacturing Co, Minneapolis, USA) e utilizzate per la co-coltura o ripiastrate ad una diluizione di 1:3 per le MSCs e di 1:10 per la linea di CRC.

La co-coltura bidimensionale di cellule tumorali e MSCs è stata eseguita per l'analisi citofluorimetrica e dell'espressione genica. Cellule tumorali e cellule mesenchimali sono state piastrate insieme in un rapporto 1:1 in fiasche T25 e coltivate per cinque giorni in terreno di coltura per cellule tumorali (Figura 4). Successivamente le cellule sono state lavate con PBS, staccate con tripsina e centrifugate a 1500rpm per 5 minuti, per essere poi utilizzate per le successive analisi.

## ***GENERAZIONE DI SFEROIDI UTILIZZANDO IL METODO “HANGING DROPS”***

Gli sferoidi tumorali multicellulari (MCTS) sono stati generati con il metodo “*hanging drops*”<sup>5</sup>.

Le cellule sono state tripsinizzate per formare una singola sospensione cellulare.

Le cellule sono state contate, come descritto sopra, ed un numero stabilito di cellule in un volume di 350µl è stato piastrato nei pozzetti di piastre a 96 pozzetti con fondo ad “U”. Per evitare il contatto della goccia con il coperchio, sono stati inseriti degli spaziatori di plastica ai quattro angoli esterni della piastra, la piastra è stata poi invertita. In tal modo si forma una “goccia pendente” e le cellule sono indotte ad aggregarsi perché spinte verso il fondo della goccia dalla forza di gravità. Per ridurre il fenomeno dell’evaporazione, i pozzetti esterni sono stati riempiti con PBS sterile. Gli sferoidi sono stati coltivati in incubatore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

Per la co-coltura in 3D sono stati testati diversi rapporti in numero di cellule tra cellule tumorali e cellule mesenchimali, e le cellule sono state coltivate in terreno di coltura utilizzato per le cellule tumorali.

La progressiva formazione dello sferoide è stata valutata dopo 3-4 giorni di coltura e fino a 14 giorni, utilizzando un microscopio invertito a contrasto di fase (Nikon Eclipse TS100, Nikon Co.) dotato di camera digitale (Nikon DS-2MBWc, Nikon Co). Le dimensioni degli sferoidi sono state valutate attraverso riferimento micrometrico a seguito dell’acquisizione con Image-Pro Plus (Version 4.5.1, Media Cybernetics).

## ***OTTIMIZZAZIONE DEL METODO “HANGING DROPS”: “LID SYSTEM”***

Per semplificare la manipolazione dei singoli sferoidi e per ridurre la quantità di terreno di coltura utilizzato, sono state apportate alcune modifiche alla procedura sopra descritta. La coltura degli sferoidi è stata eseguita in “*lid system*”, utilizzando il coperchio di una piastra standard a 96

pozzetti con fondo a “U”<sup>42</sup>. Le cellule sono state piastrate in 20µl di terreno di coltura all’interno dei cerchi segnati sul coperchio, che delimitano gli spazi dei singoli pozzetti. I pozzetti della piastra sono stati invece riempiti con 200µl di PBS per ridurre il fenomeno dell’evaporazione. Dopo aver inserito gli spaziatori agli angoli della piastra, il coperchio è stato invertito e posto sulla piastra, secondo il normale orientamento della piastra. Tale procedura deve essere eseguita delicatamente per evitare che la goccia di sospensione cellulare tenda ad allargarsi e tocchi il bordo del cerchio, in tal caso, infatti, la goccia non avrà una struttura stabile e questo influenzerà la morfologia dello sferoide.

La progressiva formazione dello sferoide è stata verificata dopo 3 e 4 giorni di coltura, invertendo il coperchio e visualizzando i singoli sferoidi con un microscopio invertito a contrasto di fase (Nikon Eclipse TS100, Nikon Co.) dotato di camera digitale (Nikon DS-2MBWc, Nikon Co). Dopo aver acquisito le immagini con obiettivo 10X, è stato misurato il diametro degli sferoidi con il programma Image-Pro Plus (Version 4.5.1, Media Cybernetics). Una volta raggiunte le dimensioni ottimali, gli sferoidi sono stati raccolti con una pipetta manuale (Eppendorf Research® 0,5-10µl), utilizzando uno stereomicroscopio (Zeiss Stemi dv 4, Carl Zeiss Inc.).

### ***SISTEMA GRAVITYPLUS™***

Il sistema GravityPlus™, sviluppato dalla InSphero (InSphero AG, Zurich, Switzerland), permette la formazione di sferoidi o micro-tessuti di dimensioni omogenee mediante la tecnologia “*hanging drops*” (Figura 5).

A differenza dei metodi tradizionali, la procedura può essere eseguita dall'alto senza dover invertire la piastra. Il sistema è stato ideato per consentire il regolare cambio del terreno di coltura e rappresenta quindi un metodo ottimale per le colture a lungo termine.



Il sistema GravityPlus™ è costituito da una piastra a 96 pozzetti strutturati come una “clessidra”, appositamente progettati per la formazione di gocce stabili. Il punto d’ingresso superiore consente l’applicazione dall’alto della sospensione cellulare e/o del terreno di coltura che, tramite un micro canale capillare, passa nella concavità inferiore dove la goccia viene stabilizzata mediante forze capillari. Le cellule sono indotte ad aggregarsi perché spinte verso il fondo della “goccia sospesa” dalla forza di gravità. Non c’è possibilità di interazione con le superfici artificiali che potrebbero influire sulla crescita e sulla funzionalità cellulare (Figura 5).

Per garantire l’accuratezza del sistema abbiamo utilizzato una pipetta elettronica VIAFLO da 300µl a 12 canali (INTEGRA, Biosciences AG), come consigliato dal protocollo InSphero.

La sospensione cellulare è stata preparata tripsinizzando le linea HT29 e le MSCs espanse in coltura cellulare 2D secondo il protocollo standard. Mediante titolazione è stata stabilita la correlazione ottimale tra numero di cellule iniziale e la dimensione dello sferoide utilizzando 100, 500, e 1000 cellule in totale, con proporzione MSCs : Cellule tumorali pari a 1:4.

Per ciascun pozzetto abbiamo utilizzato 40µl di sospensione cellulare, mantenendo la velocità di pipettamento tra 10 e 50µl/sec.

Il fattore critico per le colture cellulari a lungo termine è l’evaporazione della goccia, a causa della natura del metodo “*hanging drops*”, che determina un alto rapporto superficie di esposizione/volume. Per ottenere un basso tasso di evaporazione, la piastra inferiore viene riempita con 5ml di PBS 0.2-0.5X con 0.1% Triton-X100. La piastra centrale, contenente i pozzetti, presenta inoltre dei canali esterni che possono essere riempiti con 2ml di acqua sterile, che costituisce una barriera per il vapore tra il compartimento interno della piastra e l’ambiente dell’incubatore, così da garantire un miglior controllo dell’umidità. La piastra GravityPlus™ è stata quindi collocata in incubatore a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>, posizionando la piastra in posizione orizzontale ed evitando di urtare eventuali ostacoli.

Il primo cambio del terreno di coltura è stato eseguito dopo 4 giorni dall’inizio della coltura e successivamente ogni 3-4 giorni.

La rimozione del terreno di coltura è stata effettuata aspirando 20µl di terreno di coltura dalla goccia e successivamente aggiungendo 20µl di medium fresco, procedendo a bassa velocità per evitare turbolenze all'interno della goccia che potrebbero portare ad aspirare accidentalmente il micro-tessuto. Questo passaggio è stato ripetuto 2 volte per assicurare la quantità di volume massimo per il cambio del terreno di coltura.

Gli sferoidi si trovano, infatti, nella parte inferiore della goccia a causa della loro maggiore densità, questo consente di poter aspirare fino al 75% del volume del terreno di coltura (ad esempio se vengono usati 40µl di volume iniziale possono essere rimossi fino a 30µl) senza rimuovere lo sferoide.

Per raccogliere/trasferire gli sferoidi è stato posto al di sotto della piastra GravityPlus™ il coperchio di una piastra standard a 96 pozzetti. Mediante la pipetta multicanale è stata riempita la goccia di circa 100µl di aria, cosicchè la goccia sia appesantita dalla bolla d'aria e possa cadere nel coperchio ricevente. Successivamente è stato possibile raccogliere gli sferoidi singolarmente con una pipetta manuale (Eppendorf Research® 0,5-10µl) e utilizzando lo stereomicroscopio (Zeiss Stemi dv 4, Carl Zeiss Inc.).

### ***STUDIO DELLA FORMAZIONE DELLO SFEROIDE MEDIANTE COLORAZIONE CON CFSE***

Per poter studiare l'evoluzione della crescita dello sferoide abbiamo utilizzato cellule tumorali marcate con CFSE (5-carboxyfluorescein succinimidyl ester) 1µM, un colorante fluorescente vitale che diffonde liberamente nelle cellule senza alterarne la struttura e le caratteristiche. In questo modo è stato possibile seguire a vari *timepoints* l'aggregazione delle cellule su un pre-esistente sferoide di MSCs e successiva formazione di un unico sferoide fino al quarto giorno di coltura (Figura 6).

Come primo *step* è stata messa in coltura una sospensione di 300 MSCs in 20µl, non colorate con il CFSE, mediante “*lid system*”. Dopo 3 giorni una sospensione di 300 cellule tumorali colorate con CFSE in 10µl è stata inserita nella preesistente goccia. Le cellule sono state risospese in CFSE (1µM) diluito in PBS e incubate per 10 minuti, protette dalla luce, in un bagno termostatico a 37°C. Una volta terminato il periodo di incubazione, l’azione del CFSE è stata bloccata aggiungendo lo stesso volume di siero (FCS) per 5 minuti, sono stati poi effettuati 3 lavaggi in PBS e infine le cellule sono state contate e utilizzate per l’esperimento.

A diversi *timepoints* (1 ora, 8 ore, 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni e 4 giorni) le immagini degli sferoidi durante la loro formazione sono state acquisite al microscopio in campo chiaro per la struttura complessiva di entrambe le popolazioni, e in fluorescenza per poter discriminare le cellule tumorali, fluorescenti per il CFSE, dallo sferoide di MSCs non fluorescente.

### ***IMMUNOISTOCHEMICA (IHC) E COLORAZIONE CON EMATOSSILINA/EOSINA***

Un numero variabile di sferoidi di cellule tumorali e in co-cultura con MSCs (circa 10) è stato lavato in PBS e fissato in metanolo assoluto a -20°C per 10 minuti. Dopo un breve lavaggio in PBS, gli sferoidi sono stati inclusi in resina inerte (OCT, CellPath Ltd UK) e sono stati successivamente criosezionati, al fine di ottenere sezioni di 10µm di spessore, con il criostato (Microm Carl Zeiss, HM560). Le sezioni seriali dell’intero blocco di OCT sono state montate su vetrini Superfrost (Menzel-Glaeser, Braunschweig, DE) e sono state conservate a -80°C, in scatole contenenti silica gel per l’assorbimento dell’umidità residua, fino al momento del loro utilizzo.

Le sezioni sono state, poi, lasciate a temperatura ambiente per alcuni minuti per consentire il graduale innalzamento della temperatura ed, in seguito, sono state incubate in una stufa da laboratorio a 42°C per 15 minuti.

Una soluzione proteica di siero normale di capra (1% in PBS, Sigma G9023) è stata utilizzata per prevenire legami aspecifici durante la successiva incubazione dell'anticorpo primario. Le sezioni sono state immerse per 30 minuti nella soluzione.

L'anticorpo monoclonale HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1, variante alfa) (AbCam, clone mgc3, ab16066) è stato diluito 1:25 in buffer di diluizione (Dako S3022), equivalente ad una concentrazione finale di immunoglobuline (Mouse IgG1) di 40 $\mu$ g/ml.

L'anticorpo è stato applicato sulle sezioni rimuovendo solo parzialmente la soluzione di siero di capra, 100 $\mu$ l per vetrino sono stati sufficienti a ricoprire totalmente gli sferoidi presenti.

L'incubazione si è protratta per 16 ore a 4°C in camera umida.

Successivamente i vetrini sono stati sciacquati per 30 minuti a temperatura ambiente (3 lavaggi da 10 minuti ognuno) in acqua bi-distillata.

L'anticorpo primario è stato rilevato attraverso un anticorpo secondario recante un polimero coniugato a più molecole di fosfatasi alcalina (Histofine Simplestain AP M), applicato alle sezioni ed incubato per 30 minuti a temperatura ambiente.

Il complesso primario-secondario è stato poi rilevato attraverso reazione enzimatica aggiungendo un opportuno substrato cromogenico (Histofine 415161F, New Fuchsin Substrate Kit) per 5 minuti a temperatura ambiente.

La reazione enzimatica è stata poi bloccata immergendo i vetrini in acqua di fonte.

Una colorazione nucleare è stata eseguita utilizzando ematossilina (Sigma MHS16) ed acqua di fonte per differenziare opportunamente la colorazione.

I vetrini sono stati, infine, montati utilizzando glicerolo-gelatina (Sigma GG1) come mezzo di montaggio, data la solubilità in alcool del substrato di colorazione utilizzato in precedenza.

Alcune sezioni sono state invece utilizzate per la colorazione con ematossilina ed eosina. Le sezioni sono state lasciate a temperatura ambiente per alcuni minuti per consentire il graduale innalzamento della temperatura ed, in seguito, sono state incubate in una stufa da laboratorio a 42°C per 15 minuti.

In seguito i vetrini sono stati immersi in ematossilina (Sigma MHS16) per 1 minuto, lavati in acqua di fonte per differenziare il colore dei nuclei e poi lavati in acqua distillata. Successivamente i vetrini sono stati immersi in eosina (Sigma HT110216-500M) per 1 minuto, poi disidratati in etanolo 90% e 100% per pochi secondi, ed, infine, in xylene, sono stati poi montati con resina sintetica Pertex™ (MEDITE).

### ***SAGGIO DI VITALITÀ/CITOTOSSICITÀ LIVE/DEAD®***

Il saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD® (Molecular Probes, Invitrogen) permette di rilevare le cellule vive e le cellule morte con due diverse sonde fluorescenti che riconoscono l'attività esterasica intracellulare e l'integrità della membrana plasmatica.

Le cellule vive presentano attività esterasica intracellulare ubiquitaria, determinata dalla conversione enzimatica della calceina AM, un permeante cellulare non fluorescente, nel colorante polianionico calceina fluorescente in verde intenso (ecc/em ~495 nm/ ~515 nm).

Le cellule che presentano un danno della membrana plasmatica sono invece permeabili all'etidio omodimero-1 (EthD-1), che legandosi agli acidi nucleici produce una fluorescenza in rosso, identificando quindi le cellule morte (ecc/em ~495 nm/ ~635 nm).

E' stato possibile applicare il saggio LIVE/DEAD® sugli sferoidi tumorali e in co-coltura con MSCs raccolti singolarmente dopo coltura nelle piastre GravityPlus™.

La soluzione necessaria per il saggio LIVE/DEAD® è stata preparata seguendo il protocollo del produttore: 20µl della soluzione stock di EthD-1 2mM sono stati aggiunti a 10ml di PBS sterile.

A questa soluzione sono stati aggiunti 5µl della soluzione stock di calceina AM 4mM. La soluzione finale risulta quindi costituita da calceina AM 2µM e EthD-1 4µM.

All'interno di una vaschetta di plastica, utilizzata per l'inclusione in OCT, (*cryomold*, 15mm x 15mm x 5mm, Tissue-Tek® Sakura) sono stati posti circa 10 sferoidi, che sono stati ricoperti con

200µl della soluzione ottenuta precedentemente e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente protetti dalla luce.

In seguito la soluzione di colorazione è stata aspirata e gli sferoidi sono stati lavati con PBS per pochi minuti. E' stato possibile visualizzare gli sferoidi direttamente nella *cryomold* utilizzando un microscopio invertito equipaggiato per la fluorescenza (OLYMPUS IX50, Olympus Switzerland, Volketswil, Switzerland). Successivamente gli sferoidi sono stati fissati, inclusi e criosezionati come descritto in precedenza. Le sezioni ottenute sono state lavate in PBS per circa 10 minuti, per eliminare i residui di OCT, asciugate ed infine i vetrini sono stati montati con vetrino coprioggetto utilizzando il mezzo di montaggio Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma F4680) e quindi analizzati al microscopio equipaggiato per la fluorescenza (OLYMPUS BX61, Olympus Switzerland, Volketswil, Switzerland) e/o al microscopio confocale (Zeiss LSM-710 system Axio Imager Z2 stand) e le immagini sono state acquisite con ingrandimento 10x e 20x.

## ***IMMUNOFLUORESCENZA***

Le sezioni ottenute da criosezionamento sono state utilizzate anche per colorazioni di immunofluorescenza.

Per eliminare i residui di OCT i vetrini sono stati immersi in PBS per circa 10 minuti. È stato effettuato il blocco dei siti aspecifici mediante l'uso di una soluzione di siero di capra al 3% e Triton-X100 allo 0.3% diluiti in PBS 1X (*Blocking Buffer*) per 45 minuti a temperatura ambiente in camera umida. L'anticorpo primario è stato poi applicato sulle sezioni rimuovendo solo parzialmente la soluzione di siero di capra, 150µl per vetrino sono stati sufficienti a ricoprire totalmente gli sferoidi presenti.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) (clone VU1D9) (5488S), anticorpo monoclonale prodotto in topo e coniugato con Alexa Fluor 555 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA,), diluizione 1:100.
- Anti-Ki67 (clone SP6) (FITC) (ab27619), anticorpo monoclonale prodotto in coniglio e coniugato con Alexa Fluor 488 (Abcam Inc., Cambridge, USA,), diluizione 1:50.
- Cleaved-Caspase 3 (CC3) (clone Asp175) (9661), anticorpo policlonale prodotto in coniglio (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA,), diluizione 1:200.
- ERM-binding phosphoprotein (Anti-EBP50) (611161), anticorpo monoclonale prodotto in topo (BD, Trasdution Laboratories, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), diluizione 1:50.

Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti nel *blocking buffer* utilizzato precedentemente per il blocco dei siti aspecifici, per ridurre un eventuale *backgroud*, e sono stati incubati 60 minuti a temperatura ambiente protetti dalla luce in camera umida.

I vetrini sono stati poi lavati in PBS per 15 minuti (3 lavaggi da 5 minuti ognuno) e leggermente asciugati.

Gli anticorpi primari non coniugati sono stati rilevati attraverso un anticorpo secondario: per la CC3 è stato utilizzato un anticorpo secondario anti-coniglio marcato con Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488, Invitrogen), per anti-EBP50 è stato utilizzato un anticorpo secondario anti-topo coniugato con Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488, Invitrogen).

L'anticorpo secondario è stato utilizzato con una diluizione 1:800 in PBS ed incubato per 60 minuti a temperatura ambiente protetto dalla luce in camera umida. Per la colorazione dei nuclei, durante gli ultimi 5 minuti di incubazione dell'anticorpo secondario, sono stati aggiunti 10µl di DAPI (D1306, Invitrogen) diluito 1:100 in PBS, su ogni sezione del vetrino. Per le sezioni colorate con gli anticorpi primari già coniugati, il DAPI è stato aggiunto con la stessa modalità durante l'incubazione dell'anticorpo primario.

I vetrini sono stati poi lavati in PBS per 15 minuti (3 lavaggi da 5 minuti ognuno), asciugati ed infine montati con vetrino coprioggetto utilizzando il mezzo di montaggio Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma F4680) e quindi analizzati al microscopio equipaggiato per la fluorescenza (OLYMPUS BX61, Olympus Switzerland, Volketswil, Switzerland) e/o al microscopio confocale (Zeiss LSM-710 system Axio Imager Z2 stand).

### ***ANALISI DI MARCATORI DI SUPERFICIE MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO***

Gli sferoidi di cellule tumorali e in co-coltura con MSCs sono stati digeriti usando una soluzione di tripsina e 1% di collagene tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Dopo la digestione, le cellule ottenute sono state risospese in FACS buffer composto da PBS, 0,5% di BSA e 5mM di EDTA, contate con l'emocitometro di Neubauer e divise in diversi campioni per l'analisi citofluorimetrica (concentrazione minima  $5 \times 10^4$  cellule, concentrazione massima di  $1 \times 10^6$  cellule per campione).

Le cellule sono state incubate a 4°C, protette dalla luce, con anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi specifici per 15 minuti, lavate con FACS buffer, centrifugate per 2 minuti a 2000rpm e infine risospese in un volume di 100ul di FACS buffer. Lo ioduro di propidio (PI, 1µg/ml, BD Bioscience) è stato usato per escludere le cellule morte.

L'analisi dei marcatori di superficie è stata effettuata al citofluorimetro FACSCalibur® (Becton-Dickinson). Per l'analisi dei risultati è stato utilizzato il software FlowJo (Tree Star Oregon Corporation, Stanford University).

Per l'analisi di ogni coltura è stato valutato un pannello di marcatori di superficie di interesse:



Antigene	Brand	Fluorocromo	Concentrazione
CD24	BD	PE	1:25
CD44	BD	FITC	1:25
CD44	BD	PE	1:25
CD133	BD	PE	1:25
CD166	BD	PE	1:25
EpCAM	BD	APC	1:25
CD90	BD	FITC	1:200

FITC = Fluorescein isothiocyanate

APC = Allophycocyanin

PE = Phycoerythrin

### ***ESPRESSIONE GENICA***

Gli sferoidi sono stati raccolti in numero sufficiente per l'estrazione di RNA totale con il Kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH) seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione e l'integrità degli RNA estratti sono stati determinati usando uno Spettrofotometro NanoDrop1 ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). In seguito 200ng di RNA totale sono stati retrotrascritti mediante l'utilizzo dell'enzima trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen) secondo il protocollo del produttore, i cDNA sono stati amplificati con Real Time PCR quantitativa (Q-RT-PCR) utilizzando un sistema ABI Prism 7900HT<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). L'espressione genica è stata analizzata utilizzando piastre Taqman Low density Array a 384 pozzetti (TaqMan<sup>®</sup> Low Density Arrays, Applied Biosystem) personalizzate con primer pre-caricati per 96 differenti geni, di cui 2 *housekeeping genes*, usati come riferimento. Tale sistema ha permesso di analizzare il seguente

pannello di geni connessi alla progressione tumorale, al comportamento metastatico e alla resistenza ai farmaci. Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

Housekeeping genes	Disease Markers	Cancer Stem Cell	Proliferation	Apoptosis	Adhesion Molecules	EMT	Growth Factors	Growth Factor Receptors	CK/CK Receptors	Therapeutic Markers	Signalling Pathways
18S	TP53	CD133	MK67	BCL2	ITGA2	E-cadherin	VEGFA	FLT-1/VEGFR1	CXCL12/SDF-1	COX-2/PTGS2	IDO1
GAPDH	KRAS	CD44	PCNA	BIRC5 (survivin)	ITGA3	N-cadherin	VEGFB	FLK1/KDR/VEGFR2	CCL5/RANTES	EP2/PTGER2	LEF1
	BRAF	CD166		TNFRS6 (Fas)	ITGA5	TWIST1	VEGFC	FLT4/VEGFR3	CXCL10	EP4/PTGER4	AXIN1
	TGFB2	CD24		TRAIL-R2 (TNFRSB10)	ITGA9	SNAIL-1	HIF1A	HER1/EGFR	CXCL9		AXIN2
	SMAD4	EpCAM		TNFRSF10 (Trail)	ITGAV	SNAIL-2	EPAS1/HIF2A	HER2/ERBB2	CXCR4		TLE4
	PTEN	Lgr5		BAK1	ITGB4	ZEB-1	EGF	HER3/ERBB3	CCR5		NOTCH1
	APC	EPHB2		BAX		MMP1	IGF-1	HER4/ERBB4	CXCL16		JAG1
	CEACAM5	ALDH1A1				MMP2	IGF-2	IGFR1/FCGR1A	CX3CL1/Fractalkine		HES1
		ALDH3A1				MMP7	IL-8				HES4
		ABCG5				MMP9	IL-6				HES6
		ABCB1				MMP14					
		ABCG2				TIMP-2					
		Nanog				TIMP-3					
		Ocl4a				TIMP-4					
		Sox2									
		KL14									
		KRT20									
		MUC2									

## RISULTATI

Diverse linee cellulari umane di CRC (HCT15, COLO205, LS180, HCT116 e HT29) sono state coltivate mediante la tecnica “*hanging drops*”, utilizzando piastre a 96 pozzetti con fondo a U, per verificarne la capacità di crescita in sferoidi tumorali multicellulari (MCTS). Solo le linee HCT116 e HT29 sono state in grado di formare sferoidi compatti ed uniformi dopo 4 giorni di coltura, la linea HT29 è stata selezionata per gli esperimenti successivi.

Al fine di valutare la migliore concentrazione cellulare di partenza, è stata effettuata una titolazione partendo da una cellula fino ad arrivare ad una concentrazione massima di 10.000 cellule per pozzetto. Per quattro giorni, ogni 24 ore, è stata effettuata l’analisi al microscopio a contrasto di fase e sono stati misurati i diametri dei singoli sferoidi. Tale esperimento è servito per stabilire la concentrazione ottimale di cellule in modo da avere, dopo 4 giorni di coltura, uno sferoide di diametro  $\leq 200\mu\text{m}$  che, come riportato in letteratura, non dovrebbe presentare il *core* ipossico né necrotico.

Per testare gli effetti delle MSCs sulla proliferazione e sul comportamento delle cellule tumorali in 3D è stata effettuata una co-coltura. Varie percentuali di MSCs e di cellule tumorali sono state testate mediante titolazione, per permettere una buona proliferazione di entrambe le popolazioni. Dopo quattro giorni di coltura, gli sferoidi sono stati raccolti e digeriti con tripsina e collagenasi ed analizzati mediante citofluorimetria. Utilizzando un anticorpo specifico per EpCAM, marcatore di cellule epiteliali, e per CD90, marcatore di cellule mesenchimali, è stata valutata la percentuale relativa delle cellule tumorali e MSCs presenti alla fine della co-coltura (Figura 7).

I risultati hanno evidenziato un rapporto ottimale pari ad 1:4 tra MSCs e cellule tumorali, in quanto alla fine della co-coltura è stato possibile trovare una percentuale più alta di MSCs rispetto agli altri rapporti cellulari testati. Bisogna infatti tener presente che le MSCs non crescono facilmente in 3D e dopo co-coltura la percentuale di cellule vitali ancora presenti è veramente esigua.

Il primo metodo testato, quello in “*hanging drops*” in piastra a 96 pozzetti con fondo a U, si è rivelato non ottimale, in quanto la raccolta degli sferoidi alla fine della coltura è risultata inefficiente e disagiata. È stato impossibile raccogliere tutti gli sferoidi dal momento che è necessario invertire la piastra a 96 pozzetti su una piastra petri da 150mm, dove far cadere gli sferoidi ed il terreno di coltura che li contiene, in seguito con la pipetta e con l’aiuto di uno stereomicroscopio bisogna raccogliere i singoli sferoidi. Non è stato inoltre possibile effettuare il cambio del terreno di coltura e la quantità di terreno di coltura necessaria per la coltura di un singolo sferoide è eccessiva (350µl per un singolo sferoide).

Si è quindi passati a testare il secondo metodo, quello del “*lid system*”, coltivando le cellule per 4 giorni sul coperchio di una piastra a 96 pozzetti, tale sistema è ottimizzato per una ridotta quantità di sospensione cellulare (20-30µl). Anche con questo metodo non è possibile cambiare il terreno di coltura, quindi non è possibile mantenere in coltura le cellule per più di quattro o cinque giorni, altrimenti cataboliti e tossine possono andare ad alterare la crescita degli sferoidi. Tuttavia il “*lid system*” permette una manipolazione più efficiente degli sferoidi, infatti è possibile raccogliere quest’ultimi semplicemente invertendo il coperchio della piastra a 96 pozzetti e la ridotta quantità di volume presente rende più facile tale operazione.

Il passaggio alle piastre commerciali GravityPlus™ è stato infine necessario per poter seguire la crescita degli sferoidi a lungo termine e permettere così la formazione di sferoidi a diversi stadi di maturazione (Figura 5). Tale metodo è maggiormente standardizzato, permette la formazione di sferoidi di dimensioni costanti, ma ovviamente è svantaggioso dal punto di vista economico. Anche in questo caso è stato necessario effettuare una cinetica di crescita delle HT29 ± MCSs, per poter comparare il comportamento delle cellule osservato con i primi due metodi di coltura e per stabilire il numero ottimale di cellule di partenza. Sono state analizzate tre concentrazioni 100, 500 e 1000 cellule per pozzetto. La concentrazione iniziale di 100 cellule è risultata sufficiente per avere dopo 4 giorni un diametro  $\leq 200\mu\text{m}$  e per raggiungere dopo 14 giorni di coltura un diametro  $> 500\mu\text{m}$ , sia per la monocoltura che per la co-coltura con MSCs (Figura 8). Tale metodo di coltura è stato dunque scelto per gli esperimenti successivi utilizzando una

concentrazione iniziale di 100 cellule per pozzetto. Sono stati inoltre fissati 3 *timepoints*, per stabilire i diversi stadi di maturazione degli sferoidi (Figura 2):

1. Assenza di ipossia
2. Presenza di ipossia
3. Presenza di ipossia/necrosi

Al termine della monocultura di HT29 e della co-cultura in presenza di MSCs, gli sferoidi ottenuti sono stati quindi analizzati per i seguenti parametri:

- Morfologia ed analisi della conformazione interna degli sferoidi,
- Localizzazione delle cellule proliferanti,
- Presenza e localizzazione di cellule apoptotiche/necrotiche,
- Ipossia
- Espressione dei marcatori di superficie
- Espressione genica.

## ***ANALISI DELLA FORMAZIONE DELLO SFEROIDE***

Nell'esperimento condotto mediante colorazione con CFSE è stato possibile seguire la formazione dello sferoide da parte delle cellule tumorali HT29 su un preesistente sferoide formato da MSCs (Figura 6).

Durante le prime 24 ore le cellule tumorali hanno iniziato ad aggregarsi nella zona della goccia dove era presente lo sferoide di MSCs. A partire dal secondo giorno di coltura le cellule tumorali hanno creato una struttura compatta attorno allo sferoide, fino ad addensarsi nel quarto giorno a formare un unico sferoide.

## **MORFOLOGIA**

La morfologia degli sferoidi tumorali in monocultura e in co-cultura con MSCs è stata valutata mediante microscopia a contrasto di fase (Figura 4). Abbiamo osservato la formazione di sferoidi compatti e di dimensioni omogenee all'interno della piastra.

Mediante colorazione con ematossilina-eosina è stato possibile analizzare la conformazione interna degli sferoidi (Figura 9). Nel I *timepoint* (6 giorni di coltura) le cellule all'interno dello sferoide sono regolarmente distribuite e ben compattate. Nel II *timepoint* (9 giorni di coltura) la struttura interna diventa più lassa, sia in assenza che in presenza di MSCs, nella parte centrale dello sferoide si formano delle cavità, in alcuni casi delimitate da cellule ben organizzate e distribuite in maniera più o meno ordinata intorno ad un lume, in altri casi sono probabilmente artefatti determinati dal tempo e dalla modalità di congelamento o dal criosezionamento. Per poter mantenere una struttura ben definita e per evitare problemi di cross-reazioni durante le colorazioni in immunofluorescenza è stata scelta la fissazione in metanolo. Tuttavia è stato effettuato un lavaggio veloce in PBS, post-fissazione, per poter includere gli sferoidi in OCT, il metanolo infatti, non congelando, forma una struttura gelatinosa nella zona del blocco di OCT che contiene gli sferoidi e diventa quindi impossibile tagliare. Tuttavia l'eventuale presenza di PBS, anche se in minime quantità, ha causato la formazione di cristalli di ghiaccio durante la fase di congelamento effettuato su ghiaccio secco, che potrebbero poi aver determinato la presenza di cavità interne allo sferoide.

Nello strato esterno dello sferoide, invece, le cellule restano compatte e si appiattiscono l'una sull'altra. Nel III *timepoint* è ancora possibile osservare una struttura abbastanza compatta nella zona più esterna, mentre la struttura interna risulta disorganizzata e con una trama interna più lassa come nel caso precedente, questo fenomeno è plausibilmente dovuto anche all'aumento del tasso di mortalità cellulare all'interno degli sferoidi.

Al fine di valutare se la peculiare trama interna degli sferoidi sia dovuta solo ad artefatti o anche ad una reale organizzazione delle cellule in 3D, è stata effettuata l'analisi in immunofluorescenza

per EBP50 (ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50), una proteina espressa nella porzione apicale di cellule epiteliali polarizzate<sup>46</sup>. Dall'analisi in immunofluorescenza risulta evidente che alcune cavità potrebbero non essere artefatti, ma si tratterebbe plausibilmente di cavità dovute alla naturale tendenza delle cellule di colon a formare cripte ed adenomeri. Soprattutto in presenza di MSCs, gli sferoidi risultano presentare un'elevata positività per EBP50 nel lume di diverse strutture circolari, e positività analoga è stata riscontrata a livello tissutale nella mucosa normale (Figura 10).

## ***IMMUNOFLUORESCENZA***

L'analisi in immunofluorescenza é stata eseguita per caratterizzare gli sferoidi in termini di vitalità, proliferazione, necrosi ed organizzazione cellulare.

L'analisi della vitalità/citotossicità cellulare, mediante il saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD<sup>®</sup>, è stata effettuata sugli sferoidi appena raccolti (a fresco) e a seguito di fissazione ed inclusione in OCT (Figura 11). Il forte segnale fluorescente che si accumula dai vari piani focali, la ridotta profondità di campo di obiettivi ad elevato ingrandimento, nonché le dimensioni elevate degli sferoidi non consentono di ottenere immagini di buona qualità in fluorescenza. Anche l'analisi al microscopio confocale non ha restituito risultati soddisfacenti a causa di alcuni inconvenienti tecnici quale la presenza di PBS e la struttura rigida delle piastre in cui sono contenuti gli sferoidi. Tali inconvenienti rendono impossibile la messa in opera o la messa a fuoco con questo microscopio.

In seguito a fissazione, inclusione in OCT e taglio al criostato è stato invece possibile visualizzare ed acquisire immagini al microscopio in fluorescenza. Abbiamo riscontrato la localizzazione delle cellule vive nella parte esterna degli sferoidi e la presenza di cellule morte a livello della zona centrale, con un aumento di queste ultime in rapporto all'evoluzione e quindi all'aumento dei diametri degli sferoidi. Tuttavia le immagini ottenute non sono risultate

soddisfacenti in quanto si è riscontrata una marcata diminuzione del segnale fluorescente nelle criosezioni rispetto alla colorazione *whole mount* (Figura 11). In questo modo si perdono delle informazioni, come ad esempio la presenza di cellule vive (positive per la calceina) nella zona centrale dello sferoide, o la presenza di cellule morte (positive per l'EthD-1), anche se in numero molto esiguo, sullo strato esterno dello sferoide, che è possibile invece osservare nel caso della colorazione *whole mount*.

In seguito, mediante colorazioni di immunofluorescenza per Ki-67 e Caspasi 3 Clivata (CC3), è stato possibile individuare rispettivamente le cellule proliferanti e le cellule apoptotiche (Figura 12).

Nel I *timepoint* è possibile osservare la presenza di cellule proliferanti (Ki-67+), diffusa in tutto lo sferoide. Nel II e III *timepoint* le cellule proliferanti sono essenzialmente confinate nello strato più esterno dello sferoide, mentre negli strati più interni le cellule positive sono relativamente poche ed isolate.

La colorazione per la CC3 ha permesso invece di individuare le cellule apoptotiche. Nel I *timepoint* si osserva la presenza di poche cellule apoptotiche all'interno degli sferoidi. Nel II *timepoint* è invece chiaramente visibile la presenza di cellule necrotiche/apoptotiche nella zona centrale degli sferoidi, mentre nel III *timepoint* cellule positive per la CC3 creano un vero e proprio *core* esteso all'interno dello sferoide.

Purtroppo non è stato possibile effettuare una doppia colorazione, dal momento che i due anticorpi utilizzati per Ki-67 e CC3 sono sviluppati nella stessa specie (coniglio), ed anche effettuando un'incubazione differenziale per entrambi gli anticorpi, non è stato conseguito un buon risultato poichè il Ki-67 è già coniugato in FITC e la CC3 ha presentato un elevato background usando un secondario TRITC. Dal momento che sono state tagliate al criostato sezioni seriali degli sferoidi dello spessore di 10µm, è stato possibile comparare lo stesso sferoide con entrambe le colorazioni.



I risultati ottenuti per il Ki-67 e per la CC3 sono comunque concordanti con i dati ottenuti dal saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD<sup>®</sup>, per questo motivo abbiamo preferito utilizzare le colorazioni per Ki-67 e CC3 per i nostri scopi.

## ***IPOSSIA***

L'HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1, subunità alpha) è stato utilizzato per valutare la presenza e diffusione del *core* ipossico all'interno degli sferoidi. La colorazione per l'HIF1 $\alpha$  è stata effettuata molte volte in immunofluorescenza senza ottenere una buona colorazione, purtroppo il segnale del regolatore trascrizionale è abbastanza debole e incrementando l'incubazione e la concentrazione dell'anticorpo non è stato possibile incrementare il rapporto segnale/rumore con scarsi risultati finali. Si è scelto dunque di effettuare un'analisi in immunisto chimica, grazie all'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato ad un polimero coniugato a sua volta a più molecole di fosfatasi alcalina, in questo modo è stato possibile determinare in maniera accurata il segnale effettivo dell'anticorpo (Figura 13).

Un ulteriore problema è stato riscontrato durante l'acquisizione delle immagini al microscopio, a causa di uno scarso rapporto di superficie citoplasma/nucleo, l'ematossilina, utilizzata come colorante nucleare, mascherava la debole colorazione in rosso del substrato della fosfatasi alcalina, localizzata prevalentemente a livello citosolico. Un'analisi computazionale basata su un algoritmo di deconvoluzione delle immagini acquisite, nonché la trasformazione delle risultanti immagini in immagini binarie (B/W) e l'applicazione di un filtro di riduzione del disturbo (filtro parametrico dimensionale), ha reso evidente il segnale specifico per l'HIF1 $\alpha$ . L'analisi dell'immagine binaria ha reso più evidente l'effetto bordo (edge effect), un artefatto spesso causato da pieghe e/o distacco del tessuto, da spessore eccessivo e/o da accumulo di IgG durante gli esperimenti di immuno-localizzazione proteica.

Dall'analisi dei tre *timepoints* è risultata visibile la presenza di poche cellule ipossiche nel I *timepoint*, mentre nel II *timepoint* e ancor di più nel III *timepoint* la presenza di un *core* ipossico ben distribuito. Comparando inoltre gli sferoidi in presenza ed in assenza di MSCs, risulta visibile una maggiore presenza di cellule ipossiche negli sferoidi con MSCs rispetto agli sferoidi generati in monocultura.

### ***ESPRESSIONE DI MARCATORI DI SUPERFICIE***

L'espressione di un pannello di molecole di superficie, considerate marcatori putativi di cellule tumorali staminali, è stata valutata nelle cellule HT29 e nella co-coltura con MSCs mediante citofluorimetria a flusso.

Una prima analisi è stata effettuata utilizzando il CD90 come marcatore di cellule mesenchimali, per andare a valutare la percentuale di entrambe le popolazioni nella co-coltura nei diversi *timepoints*. È stata riscontrata la presenza di MSCs soltanto nel primo *timepoint*, mentre nel secondo e terzo non è stato possibile detectare nessuna cellula CD90 positiva.

Sono state osservate variazioni più o meno significative nell'espressione di marcatori di staminalità nelle cellule coltivate in 2D ed in 3D (Figura 14).

Analizzando il comportamento delle cellule HT29 coltivate in 3D rispetto al 2D, in assenza di MSCs, è possibile osservare una down-modulazione di alcuni marcatori di cellule staminali tumorali, CD44, CD166, CD133 e CD24.

Comparando invece, il comportamento delle cellule tumorali in presenza di MSCs in 3D rispetto al 2D, è possibile osservare come la presenza delle MSCs induca un decremento dell'espressione di CD44, CD166 e CD24 nel II e III *timepoint*, è possibile notare invece un incremento nell'espressione di CD44 e CD24 soltanto nel I *timepoint*. L'espressione del CD133 non sembra subire variazioni significative in presenza di MSCs.

## ***ESPRESSIONE GENICA***

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata mediante l'utilizzo di piastre Taqman Low Density Array a 384 pozzetti (TaqMan<sup>®</sup> Low Density Arrays, Applied Biosystem) per Real Time PCR, personalizzate con primer pre-caricati per 96 differenti geni, appartenenti a differenti *pathways* connessi a progressione tumorale, formazione di metastasi, resistenza ai farmaci.

Abbiamo quindi elaborato un algoritmo che ci permettesse di analizzare i 94 geni per gli 8 campioni investigati (2D, 3D/1TP, 3D/2TP, 3D/3TP con e senza MSCs), in modo da poter confrontare l'espressione genica nelle diverse condizioni (Figura 15).

Una prima analisi è stata effettuata per comparare il comportamento delle cellule coltivate in 2D rispetto a quelle coltivate in 3D. In seguito è stata comparata l'espressione genica delle cellule co-coltivate con MSCs in 2D rispetto a quelle in 3D.

L'analisi ha evidenziato 5 principali *pathways* in cui la crescita in 3D ha comportato modifiche nell'espressione genica (progressione tumorale, apoptosi, invasività e metastasi, angiogenesi, staminalità) (Figura 16).

L'espressione di tutti i marcatori di progressione tumorale inseriti nello studio è risultata fortemente incrementata in 3D rispetto al 2D, in particolare tale incremento è stato visto essere strettamente correlato con l'aumentare degli stadi di maturazione dello sferoide. Inoltre in presenza di MSCs l'upregolazione di tali geni è maggiore soprattutto nei primi due *timepoints* rispetto alla monocultura. Nel III *timepoint* non è possibile osservare tale discrepanza probabilmente a causa della perdita delle MSCs durante la coltura a lungo termine.

I dati ottenuti dall'immunofluorescenza per la Caspasi 3 Clivata sono stati confermati dall'analisi dell'espressione genica sia in presenza che in assenza di MSCs, è infatti possibile osservare un incremento di FAS, TRAIL, TRAIL-R2 e BAX in 3D.

I marcatori correlati a fenomeni di migrazione ed invasività, quali MMPs e TIMPs, risultano allo stesso modo upregolati in coltura tridimensionale. In dettaglio, in monocultura è presente un aumento dell'espressione di MMP7, TIMP2 e TIMP4. In presenza di MSCs si aggiunge

l'aumento di espressione anche della MMP1. L'espressione dell'MMP7 e di TIMP4 è maggiore in co-coltura rispetto alla monocoltura nei primi 2 *timepoints*. È stato osservato lo stesso andamento per un altro importante marcatore implicato nei processi di invasività e metastatizzazione, il CXCR4.

Anche i dati ottenuti dall'immunoistochimica per l'HIF1 $\alpha$  sono stati confermati dall'indagine molecolare, è infatti presente un incremento del gene, correlato con lo stadio di maturazione dello sferoide. Nel primo e secondo *timepoint* tale incremento è maggiore in presenza di MSCs, come dimostrato già mediante immunoistochimica. In linea con l'incremento dell'ipossia osservato in 3D, è presente un incremento dell'espressione di VEGFA e VEGFB sia in monocoltura che in co-coltura.

Per quanto riguarda i marcatori di cellule tumorali staminali abbiamo osservato una notevole upregolazione di CD133, CD44, CD166 e CD24 nel terzo *timepoint*, in presenza di MSCs tale andamento per il CD133 e per il CD24 è presente già a partire dal secondo *timepoint*. Inoltre altri importanti marcatori di staminalità quali ALDH1A1, ABCG2, Nanog e Oct4 risultano essere upregolati nel terzo *timepoint*, per quanto riguarda la monocoltura, e nel secondo e terzo *timepoints* per la co-coltura.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le colture cellulari tridimensionali stanno migliorando progressivamente lo studio e la terapia delle patologie neoplastiche. Tuttavia ancora oggi non esiste un modello cellulare di coltura in 3D standardizzato di riferimento. In questo studio abbiamo quindi sviluppato ed ottimizzato un metodo di coltura 3D, nel nostro caso utilizzabile per linee cellulari di carcinoma del colon-retto (CRC) *in vitro*. Mediante tale metodo è stata inoltre valutata l'influenza delle cellule stromali sulle cellule tumorali per comprendere meglio il ruolo dell'interazione tumore-stroma nello sviluppo e nella crescita del tumore stesso.

Per poter studiare e analizzare in maniera più fisiologica la formazione e l'evoluzione del carcinoma del colon *in vivo*, è stato scelto di utilizzare sferoidi tumorali multicellulari (MCTS) poichè presentano un'organizzazione cellulare e una struttura tridimensionale che può mimare in maniera più efficiente quella del tumore.

L'aumento del diametro degli sferoidi, il tempo di coltura e la complessità della struttura, portano man mano alla diminuzione della diffusione di ossigeno e nutrienti e all'accumulo dei cataboliti, che determinano la morte cellulare per apoptosi o necrosi dovuta principalmente all'aumento dell'ipossia nella zona centrale dello sferoide. La normale fisiologia del carcinoma del colon prevede ugualmente la presenza di aree di tessuto altamente ipossiche e di tessuto necrotico, quindi è stato fondamentale stabilire differenti stadi di maturazione degli sferoidi per poter studiare l'influenza dell'ipossia e della necrosi sul fenotipo e sull'espressione genica delle cellule. Tale caratteristica rappresenta un ulteriore vantaggio della coltura in 3D rispetto a quella in 2D.

Sono stati comparati tre metodi di coltura basati sulla tecnica "*hanging drops*". Le modifiche apportate ai diversi sistemi hanno consentito di superare gli svantaggi riscontrati nell'utilizzo del metodo classico e successivamente nel "*lid system*". Come già evidenziato in precedenza, infatti,

tali metodi possono essere utilizzati soltanto per colture a breve termine, dal momento che non è possibile effettuare il cambio del terreno di coltura.

Le piastre GravityPlus<sup>TM</sup>, progettate esclusivamente per la formazione di sferoidi o micro-tessuti, sono state utilizzate per ottimizzare e standardizzare il sistema di coltura. L'utilizzo di questi supporti semplifica la messa in coltura e permette colture cellulari a lungo termine, grazie alla possibilità di cambiare il terreno di coltura.

Mediante titolazione è stato possibile seguire la cinetica di crescita degli sferoidi da cellule HT29 e valutare quanto, a parità di condizioni iniziali, tale metodo permettesse di ottenere sferoidi di forma e dimensione costanti a *timepoints* prestabiliti.

Per studiare il ruolo dello stroma sulla progressione tumorale siamo andati ad analizzare gli effetti delle cellule stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs) sulle cellule tumorali HT29 mediante co-coltura.

Un fattore determinante in co-culture cellulari è l'analisi delle diverse cinetiche di crescita dei diversi fenotipi cellulari: fattori come il mezzo di coltura e le interazioni intercellulari possono fortemente influenzare le cinetiche di crescita, che in taluni casi, possono differire anche notevolmente dal corrispondente modello di coltura monocellulare in 2D. Nell'ottica, dunque, di ottimizzare i parametri che potessero in qualche modo influenzare la formazione e la crescita degli sferoidi, è stato necessario effettuare delle titolazioni cellulari che tenessero conto non solo del numero di cellule di partenza per i singoli fenotipi, ma anche del rapporto tra le due popolazioni cellulari.

Le MSCs si sono dimostrate particolarmente sensibili alle condizioni sperimentali, mostrando difficoltà di proliferazione in co-culture 3D con le cellule HT29.

Durante la titolazione, dall'analisi effettuata mediante citofluorimetria, è infatti emerso che la percentuale di MSCs (positive per il marcatore CD90) era veramente esigua rispetto a quella delle tumorali. Tra le varie condizioni testate, è stato scelto un rapporto MSCs/cellule tumorali pari a 1/4, proprio perché tale rapporto è risultato essere quello con una percentuale maggiore di

cellule CD90 positive dopo 4 giorni di co-coltura (Figura 7). Ciononostante, la percentuale di MSCs all'interno degli sferoidi si è attestata a valori relativamente bassi.

L'impossibilità loro di formare una rete di interazioni e di produrre i fattori di crescita e le chemochine/citochine necessarie per poter proliferare, oltre ad un diverso tasso proliferativo che porta alla prevalenza delle cellule tumorali potrebbero essere tra le possibili cause di una così scarsa presenza di MSCs.

La necessità di avere MSCs vitali e proliferanti è importante per assicurare un buono scambio di fattori solubili, prodotti, in particolare, dalla componente stromale. È infatti noto che la presenza dello stroma possa favorire, mediante la secrezione di fattori di crescita, chemochine e citochine, la formazione e lo sviluppo del tumore, influenzando la proliferazione e la capacità invasiva delle cellule tumorali.

Il sistema sperimentale adottato mostra che la presenza di cellule tumorali e di cellule mesenchimali permette interazioni cellula-cellula più fisiologiche ed è in grado di mimare, anche se in maniera chiaramente semplificata, il microambiente tumorale *in vivo*.

Abbiamo inoltre osservato che gli sferoidi generati dalla co-coltura sono di dimensioni leggermente inferiori rispetto a quelli generati da HT29 da sole, tale risultato potrebbe riflettere una compattezza maggiore dello sferoide dovuta alla presenza di MSCs. È stato infatti precedentemente dimostrato, su sferoidi di cellule di cancro della prostata in co-coltura con stromali isolate da tessuto primario, che la presenza di cellule stromali dà luogo a segnali che stabilizzano le giunzioni aderenti incrementando le adesioni laterali delle cellule epiteliali<sup>43</sup>.

Un'ulteriore spiegazione potrebbe essere che la quantità di cellule tumorali di partenza è inferiore rispetto a quella utilizzata nella monocoltura e le MSCs, pur essendo di dimensioni maggiori rispetto alle tumorali, sono la popolazione meno proliferante all'interno dello sferoide.

La caratterizzazione degli sferoidi tumorali in monocoltura ed in co-coltura è stata effettuata mediante analisi morfologica, fenotipica e molecolare.

La struttura interna degli sferoidi si presenta spugnosa, con numerose cavità, più frequenti in presenza di cellule mesenchimali (Figura 9). Se è vero che parte di queste strutture possono

attribuirsi ad artefatti generati in fase di inclusione o taglio, in molti casi queste strutture sembrano mostrare un'organizzazione cellulare precisa intorno a quello che sembra essere un lume generato dalle cellule. Diverse evidenze suggeriscono che in sferoidi generati da cellule umane di adenocarcinoma del colon sono presenti cellule differenziate che formano strutture pseudo-ghiandolari come nel tumore *in vivo*<sup>6, 44, 45</sup>. Inoltre è stato dimostrato che in tali sferoidi le cellule tumorali esprimono maggiormente l'antigene carcino embrionario (CEA) in associazione con queste strutture, rispetto alle cellule coltivate in 2D<sup>6</sup>.

L'indagine morfologica sul possibile differenziamento cellulare interno è stata supportata dai dati ottenuti dalla colorazione di immunofluorescenza per l'antigene EBP50 (Figura 10). La proteina EBP50 o NHERF1 (ezrin-radixin-moesin (ERM) binding phosphoprotein 50; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 regulating factor 1) è una proteina adattatrice di 50kDa, normalmente localizzata nella regione apicale delle cellule epiteliali polarizzate<sup>46</sup>. Questa proteina interagisce con diverse proteine integrali di membrana ed è richiesta per il mantenimento delle proteine ERM (importati per il legame delle proteine di membrana al citoscheletro) in forma attiva fosforilata, sulla membrana apicale degli epitelii specializzati contenenti microvilli. E' stato inoltre evidenziato che l'inattivazione del gene EBP50 in topo determina anomalie ultrastrutturali dell'epitelio intestinale<sup>44</sup>.

Le cellule di adenocarcinoma HT29 sono considerate cellule intestinali pluripotenti. In condizioni standard di coltura, le cellule sono indifferenziate: crescono in multistrato, non polarizzate e non esprimono marcatori funzionali di cellule epiteliali. E' stato dimostrato che variando le condizioni di coltura, ad esempio riducendo la concentrazione di glucosio, oppure utilizzando terreno di coltura senza siero, le cellule HT29 mostrano un fenotipo differenziativo e circa il 50% delle cellule assumono caratteristiche endocrine, con presenza di mucina<sup>45</sup>.

L'analisi in immunofluorescenza per EBP50 ha mostrato chiaramente che gli sferoidi tumorali di HT29 presentano delle strutture interne ben organizzate, in cui le cellule si dispongono secondo un'organizzazione morfo-funzionale simile a quanto presente nel colon. In presenza di cellule mesenchimali, gli sferoidi sembrano presentare una quantità maggiore di tali strutture. Questo è



riportato dai numerosi studi che dimostrano come l'interazione tra tessuto epiteliale e mesenchimale sia fondamentale per i processi morfogenici e differenziativi che avvengono durante l'organogenesi e la migrazione cellulare lungo l'asse cripta-villo<sup>45</sup>. Quindi le cellule HT29 all'interno di un complesso microambiente 3D sembrano essere in grado di ricreare un epitelio differenziato come quello presente nella mucosa normale (Figura 10).

Dall'analisi morfologica effettuata mediante il saggio LIVE/DEAD<sup>®</sup> in fluorescenza, ed in seconda analisi, mediante immuno-colorazione con anticorpi anti Ki-67 e Caspasi 3 Clivata (CC3), è stato possibile osservare una chiara distribuzione, delle cellule proliferanti e cellule necrotiche/apoptotiche, in particolare a partire dal secondo *timepoint* (Figure 11 e 12). Le cellule in attiva proliferazione sono localizzate principalmente nello strato cellulare esterno dello sferoide, mentre quelle quiescenti, o necrotiche/apoptotiche, negli strati più interni. La carenza di ossigeno e glucosio nello strato più interno degli sferoidi determina l'aumento della sofferenza cellulare ed in estrema ratio la morte delle cellule in profondità<sup>20</sup>. Tale distribuzione riflette il normale comportamento delle cellule tumorali durante la progressione tumorale *in vivo*. La crescita tumorale è infatti caratterizzata da una fase di proliferazione cellulare esponenziale, seguita da una fase di diminuzione del tasso di crescita associata ad un aumento della quiescenza e del numero di cellule necrotiche. Le cellule proliferanti si trovano di solito all'interno di un paio di strati cellulari intorno ai vasi sanguigni, le cellule quiescenti e necrotiche invece si trovano progressivamente a maggiori distanze radiali dai vasi. Oltre alle cellule che diventano quiescenti, in seguito alla privazione di ossigeno, nutrienti, o fattori di crescita, come già citato, è presente un'altra tipologia di cellule, le cellule quiescenti differenziate. Sebbene la differenziazione cellulare sia su base genetica, il processo è fortemente influenzato dall'ambiente cellulare circostante, in particolare dalle interazioni tridimensionali tra le cellule e con la matrice extracellulare.

Allo stesso modo nell'evoluzione dello sferoide, abbiamo osservato che la popolazione cellulare in attiva proliferazione è confinata in 4 o 5 strati cellulari esterni, corrispondenti a circa 50µm di spessore. Tale organizzazione è conservata anche *in vitro*, pur in assenza di un sistema di

vascolarizzazione, grazie alla presenza del terreno di coltura che fornisce nutrienti ed ossigeno agli strati più esterni.

Dalle colorazioni effettuate mediante Ki-67 risulta, inoltre, che la presenza di mesenchimali induca una maggiore proliferazione in tutti e tre i *timepoints*, se comparate con il comportamento in monocultura. Tale risultato è in linea con quelli ottenuti in precedenza dal nostro gruppo che dimostrano un'elevata proliferazione tumorale in co-cultura con MSCs in 2D, dovuta alla produzione di IL-6 da parte della componente stromale<sup>47</sup>.

È stato precedentemente dimostrato che a partire dai 200µm di diametro dello sferoide, la mancanza di ossigeno si riflette sulla presenza di cellule ipossiche, che man mano vanno a formare un vero e proprio *core*. L'ipossia è presente in molti, se non tutti, i tumori solidi ed è nota sopprimere la morte cellulare indotta da farmaco e compromettere, dunque, l'efficacia della chemioterapia<sup>48</sup>. Il grado di ipossia tumorale ha un significato prognostico e tumori con elevati livelli di ipossia sono i più refrattari alla chemioterapia<sup>48</sup>. Per poter valutare la presenza di ipossia e per caratterizzare lo stadio di differenziamento dello sferoide, in cui sia presente il solo fenomeno ipossico, ma non ancora un distinto *core* necrotico, abbiamo effettuato immuno-localizzazioni dell'antigene HIF1α. Tale marcatore è un fattore trascrizionale che, in condizioni di normossia, viene rapidamente degradato, ma in condizioni di ipossia viene traslocato nel nucleo dove si accumula e va a legare gli elementi di risposta all'ipossia (HRE) ed attiva specifici geni regolati dall'ipossia<sup>49</sup>. L'immunoistochimica mostra che la presenza di MSCs si associa ad una maggiore ipossia rispetto alla monocultura (Figura 13).

Come conseguenza dell'aumento dell'ipossia le cellule vanno incontro a morte per apoptosi o necrosi. La distanza dalla periferia dello sferoide in cui si verifica necrosi può variare, a seconda del tipo di cellule e il loro tasso di consumo dei nutrienti, dalla densità cellulare e dalla concentrazione di nutrienti all'interno del terreno di coltura. Per la maggior parte dei tipi di cellule tumorali umane coltivate in condizioni ottimali di nutrienti e ossigeno, lo spessore del *core* necrotico può variare da 100 a 500µm. Dai risultati ottenuti dalla colorazione con CC3 è stato possibile osservare la presenza di un *core* necrotico/apoptotico più compatto e

maggiormente definito in presenza di MSCs, mentre nella monocultura le cellule necrotiche/apoptotiche sembrano esser di più e maggiormente diffuse all'interno dello sferoide. Probabilmente questo fenomeno è dovuto alla minore quantità di cellule proliferanti all'interno dello sferoide e alle maggiori dimensioni degli sferoidi formati dalla monocultura rispetto alla co-coltura.

Questa ben precisa organizzazione è una caratteristica molto importante da prendere in considerazione, soprattutto se si pensa che gran parte delle sperimentazioni con i farmaci utilizzano sferoidi di dimensioni molto piccole (inferiori ai 200um)<sup>20</sup>; tale dimensione potrebbe essere sufficiente per riflettere le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice in 3D, ma è chiaramente inappropriata quando si tenta di mimare le condizioni patofisiologiche in presenza di aree ipossiche e necrotiche. L'ipossia e la necrosi infatti non sono soltanto un fattore che influisce direttamente sulla radio- e farmaco-resistenza, ma comportano numerosi effetti indiretti nelle cellule tumorali, andando a modulare i *pattern* di espressione, come ad esempio nel caso dei geni regolati dall'HIF1 $\alpha$ . E' stato dimostrato che la crescita sottoforma di sferoidi di cellule del cancro della mammella o del melanoma determina una downregolazione di vari geni *DNA mismatch-repair*, un effetto che può anche essere direttamente indotto dalle condizioni ipossiche e/o necrotiche<sup>20</sup>.

Dall'analisi dell'espressione di superficie dei putativi marcatori di staminalità CD44, CD166, CD133 e CD24, effettuata mediante citofluorimetria, non è emersa nessuna variazione di rilievo rispetto al comportamento in 2D, né in presenza né in assenza di MSCs (Figura 14). La presenza delle MSCs sembra indurre un incremento dell'espressione di CD44 e CD24 soltanto al primo *timepoint*, mentre tale espressione diminuisce, poi, agli altri due *timepoints*: bisogna tener presente che le MSCs sono maggiormente presenti al primo *timepoint*, ma vanno man mano diminuendo negli altri due *timepoints*, quindi lo scarso numero di MSCs presente nei successivi *timepoints* non è sufficiente per modificare in maniera significativa l'espressione di tali molecole di superficie. Tuttavia i risultati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo, in uno studio condotto su linee cellulari di carcinoma del colon coltivate in 2D, hanno dimostrato che la

presenza di tali marcatori non identifica una reale popolazione cellulare con caratteristiche funzionali tipiche delle cellule tumorali staminali e che, probabilmente, l'analisi del comportamento e delle caratteristiche delle cellule staminali tumorali non può essere monitorata utilizzando linee cellulari<sup>50</sup>. È, infatti, molto dibattuta la reale presenza di una componente staminale all'interno delle linee cellulari e se realmente le linee cellulari siano in grado di riprodurre l'intero fenotipo e il profilo genico dei tumori da cui derivano<sup>51</sup>.

Dall'indagine molecolare sono stati ottenuti risultati paragonabili a quelli ottenuti dalla colorazione in immunistochemical per HIF1 $\alpha$ . L'incremento di ipossia riscontrato nelle colorazioni, correlato con lo stadio di maturazione dello sferoide, è stato ritrovato anche a livello genico. L'espressione del gene HIF1 $\alpha$  è fortemente aumentata, soprattutto al terzo *timepoint*, sia in presenza che in assenza di MSCs, in particolare, in presenza di MSCs, tale incremento è osservabile già a partire dal secondo *timepoint*. Bisogna tra l'altro tener presente che, come già descritto in precedenza, l'HIF1 $\alpha$  è costitutivamente espresso dalle cellule e che quello che cambia in condizioni di ipossia è la degradazione o cambio di localizzazione di tale proteina. Inoltre, contemporaneamente all'HIF1 $\alpha$ , si assiste all'incremento dell'espressione di VEGFA e VEGFB. Il VEGF (vascular endothelial growth factor) è un fattore pro-angiogenico la cui sintesi da parte delle cellule tumorali promuove la neovascolarizzazione e la neoangiogenesi, attività che consentono alle cellule un rifornimento costante di nutrienti necessari al loro metabolismo accelerato. La produzione di VEGF da parte del tumore *in vivo* crea un feedback positivo attraverso il quale l'angiogenesi indotta dal VEGF rende possibile un'ulteriore crescita tumorale. L'ipossia è uno dei principali stimoli in grado di indurre l'over-espressione del VEGF al secondo e terzo *timepoints*, in cui persiste una condizione di forte ipossia, quindi possiamo affermare che l'upregolazione del'HIF1 $\alpha$  induce l'incremento del VEGF<sup>49</sup>. Questo può determinare la produzione di vari fattori pro-angiogenici da parte delle stesse cellule tumorali o da parte della componente stromale, che rispecchia quello che avviene durante il reclutamento di cellule endoteliali e la formazione di vasi nel tumore *in vivo*. Inoltre è stato dimostrato che un'eccessiva produzione di VEGF determina la formazione di vasi immaturi, taluni aberranti, molto

permeabili, che facilitano la formazione di metastasi, permettendo la migrazione delle cellule tumorali dal sito primario ad altre zone dello stesso organo o dell'organismo.

In letteratura è stato mostrato che il microambiente ipossico di un tumore solido induce anche l'aumento di espressione di p53<sup>52</sup>. In cellule di cancro del colon è stato osservato che l'attivazione di p53, mediata dall'ipossia, non sembra indurre l'espressione dei classici geni target di p53 (come p21 e Bax), ma determina l'attivazione di una differente risposta apoptotica, andando ad upregolare l'espressione del recettore di morte Fas/CD95. Inoltre il gene Fas presenta un elemento di risposta all'HIF (HRE), localizzato a livello del sito di inizio della trascrizione, quindi è plausibile che l'HIF1 $\alpha$  agisca da cofattore per la trans-attivazione mediata da p53 nelle cellule ipossiche. In maniera simile, dai nostri dati risulta un aumento dell'espressione di p53 e di Fas in assenza di MSCs soprattutto nel terzo stadio di maturazione. Anche in presenza di cellule mesenchimali l'espressione dei due geni è in linea, è possibile osservare, infatti, un forte incremento dell'espressione di p53 e di FAS già a partire dal secondo stadio di maturazione. Bisogna inoltre ricordare che in presenza di MSCs è presente un incremento di HIF1 $\alpha$  maggiore di quello riscontrato in monocultura, quindi, anche nel nostro caso, l'HIF1 $\alpha$  potrebbe indurre l'overespressione di p53, il conseguente aumento di Fas e determinare l'incremento delle cellule apoptotiche all'interno dello sferoide (Figura 16). Tale ipotesi potrebbe inoltre essere confermata dall'upregolazione anche degli altri marcatori apoptotici analizzati, quali TRAIL e il recettore TRAIL-R2 e BAX, parallelamente all'aumento delle condizioni ipossiche in monocultura e in co-cultura, come confermato anche dall'analisi in immunofluorescenza.

Dall'analisi dei geni putativi di staminalità CD44, CD166, CD133 e CD24 si può osservare un andamento crescente dell'espressione nei tre stadi di maturazione. In cellule di neuroblastoma è stato dimostrato che l'ipossia porta ad un'inibizione del differenziamento cellulare, con conseguente mantenimento di un fenotipo *stem-like*<sup>53</sup> e vengono attivati dei *pathways* che sono associati al fenotipo indifferenziato delle normali cellule staminali, è stato visto ad esempio un aumento dell'espressione di Oct4a e Notch<sup>54</sup>. Dai dati ottenuti dall'analisi dei marcatori di

progressione tumorale è inoltre possibile osservare l'upregolazione, a partire dall'aumento di condizioni ipossiche, oltre che del già citato p53, anche di KRAS, BRAF e SMAD4. L'associazione tra la presenza di cellule ipossiche e la maggiore aggressività tumorale nonché una prognosi peggiore, è stato dimostrato esser correlata all'aumento di espressione dei marcatori di CSCs in condizioni ipossiche<sup>55</sup>. Inoltre, in un recente studio è stato dimostrato che, in linee cellulari di CRC, l'ipossia aumenta la clonogenicità delle cellule ed inoltre mantiene un fenotipo indifferenziato che è correlato all'aumento di CSCs<sup>55</sup>. Come precedentemente mostrato dall'espressione di EBP50, la linea cellulare HT29 è in grado, all'interno del microambiente tridimensionale, di organizzarsi in strutture formate da cellule polarizzate che vanno a formare strutture pseudo-ghiandolari similmente a quanto accade nel colon *in vivo* (Figura 10). Questo dato è stato riscontrato maggiormente in presenza di MSCs dove, a livello genico, nonostante una maggiore espressione dei putativi marcatori di CSCs (CD44, CD166, CD133 e CD24), in particolare al secondo e terzo *timepoint*, è possibile distinguere in generale una minore upregolazione dei geni correlati alla staminalità, come Nanog e Oct4, rispetto agli sferoidi in monocultura. La presenza delle cellule mesenchimali potrebbe dunque controllare lo stato di staminalità delle cellule tumorali, conducendole invece verso un fenotipo più differenziato, portando così ad una diversa e più precisa organizzazione strutturale.

L'apparente discrepanza tra i risultati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica e da quella molecolare può esser spiegata considerando che il CD44, CD166 e CD133 subiscono specifiche modifiche post-trascrizionali. In particolare, la proteina CD44 è una proteina transmembrana, monomerica, altamente glicosilata, la cui funzione è quella di legare l'acido ialuronico (HA) ed altre glicoproteine della matrice extracellulare. Recenti evidenze suggeriscono che il CD44 è espresso in modo aberrante in molti tumori umani, compresi alcuni tipi di carcinoma tra cui il CRC<sup>56, 57</sup>. Il ruolo e il significato prognostico del CD44 nella progressione del CRC rimane però ancora da chiarire. In alcuni casi, l'espressione di CD44 conferisce un potenziale metastatico *in vivo*, e questo si traduce in prognosi peggiore<sup>56, 58</sup>. Queste osservazioni accoppiate alla funzione di legame all'acido ialuronico (HA) hanno portato ad ipotizzare che l'adesione delle cellule

tumorali mediata da CD44 sia un fattore dominante per la regolazione delle metastasi. Inoltre il CD44 svolge i differenti ruoli in seguito a diverse modifiche, quali l'internalizzazione, il clivaggio e successiva secrezione extracellulare, oppure può agire attraverso la classica localizzazione transmembrana.

Il CD166 appartiene alla superfamiglia delle Ig e media interazioni cellula-cellula eterofile (ALCAM-CD6) ed omofile (ALCAM-ALCAM)<sup>59</sup>. Esso è considerato un marker prognostico nel melanoma, nel cancro alla prostata, nel cancro al seno, nel cancro del colon-retto<sup>60</sup> e nel cancro ovarico. Inoltre, l'aumento e la riduzione dell'espressione di ALCAM sono correlati con una prognosi infausta, a seconda del tipo di tumore<sup>60, 61</sup>. Anche tale proteina subisce modifiche post-traduzionali; Rosso *et al.* hanno dimostrato che il clivaggio o *shedding* del CD166 è coinvolto nella motilità delle cellule del carcinoma ovarico-epiteliale, ipotizzando inoltre che l'interruzione dell'adesività CD166-mediata sia uno *step* rilevante per l'aumento dell'invasività delle cellule tumorali e la conseguente metastatizzazione<sup>62</sup>.

La proteina CD133 (nota anche come Prominin-1 o AC133), è una proteina transmembrana, inizialmente descritta come un antigene di superficie specifico per cellule staminali ematopoietiche e come marcatore per le cellule murine neuro-epiteliali e molti altri epiteli embrionali. Successive indagini hanno dimostrato un'elevata espressione anche in cellule endoteliali, linfoangiogeniche, e progenitori mioangiogenici<sup>63</sup>. Sebbene la funzione biologica del CD133 rimanga sconosciuta, è riconosciuta come marker di cellule staminali per i tessuti normali e tumorali. Infatti, il CD133 da solo o in combinazione con altri marcatori è attualmente utilizzato per l'isolamento di cellule staminali da diversi tessuti<sup>64</sup>. Tuttavia, vari studi hanno suggerito che l'espressione di CD133 non è solo limitata a cellule staminali organo-specifiche<sup>65</sup>. È stato infatti osservato come, utilizzando diversi anticorpi monoclonali specifici per epitopi differenti, si ottenga una diversa localizzazione cellulare ed organo-specifica del CD133. Tali discrepanze sono state spiegate con una diversa affinità alle varie forme glicosilate del CD133<sup>63, 65</sup>. Questi dati contraddittori hanno generato confusione per quanto riguarda il reale pattern di espressione del CD133 nei tessuti adulti e nelle cellule staminali tumorali.

Tali modifiche a livello proteico potrebbero dunque creare delle discrepanze tra l'analisi dell'espressione genica e quella proteica e potrebbero far sì che ad un'elevata espressione genica non corrisponda un reale aumento della produzione delle proteine.

Infine dall'analisi molecolare della coltura in 3D è stata riscontrata un'elevata espressione di MMPs ed inibitori delle MMPs in monocultura e soprattutto in co-cultura (Figura 16). Le MMPs, espresse nell'ambiente extracellulare, possono avere come target proteine dell'ECM o altre proteine come fattori di crescita, citochine, molecole di adesione cellulare e recettori di fattori di crescita. Per questa ragione, l'attività di queste proteasi nel tumore è molto complessa e comprende effetti che sopprimono o promuovono il tumore. Il bilancio tra le proteasi e gli inibitori delle proteasi è determinante nello sviluppo del tumore, poiché sia in assenza che in eccesso di proteolisi si potrebbero verificare effetti negativi nei processi di angiogenesi<sup>28</sup>.

Le MMPs possono indurre la formazione di metastasi tramite la degradazione della matrice extracellulare e la conseguente perdita di adesività delle cellule tumorali, e tramite il rilascio di proteine o fattori di crescita ancorati alla matrice, come i fattori pro-angiogenici, che attivando la vascolarizzazione, assicurano la distribuzione di ossigeno e nutrienti nella massa tumorale e facilitano l'entrata nel circolo sanguigno delle cellule tumorali, che formeranno metastasi in altre parti dell'organismo<sup>8,27</sup>.

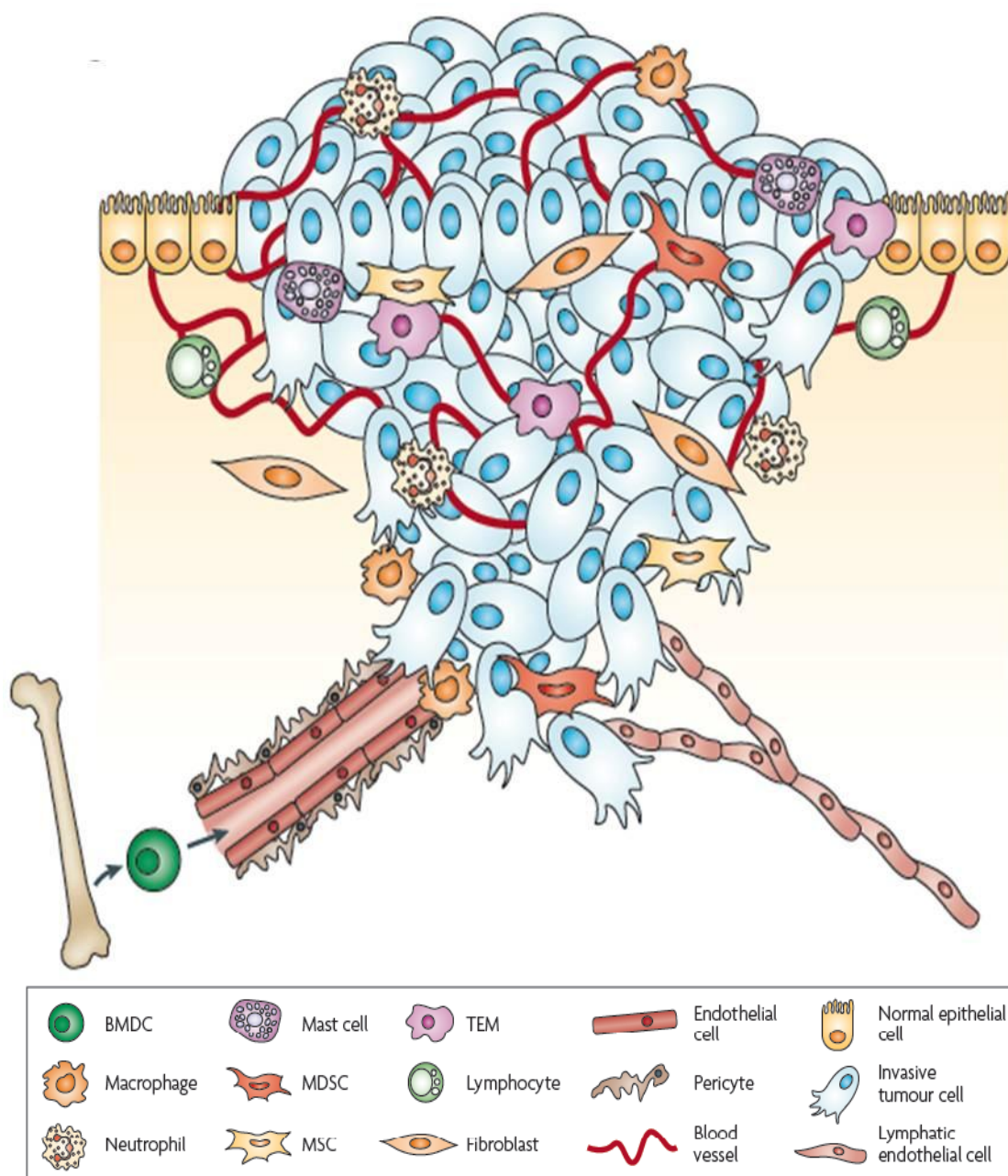
In conclusione, la coltura tridimensionale rappresenta un metodo più "fisiologico" per coltivare e studiare il comportamento di cellule del carcinoma del colon. Grazie alla coltura mediante l'utilizzo di piastre GravityPlus<sup>TM</sup> è possibile ottenere sferoidi omogenei e coltivarli per diversi giorni, in modo da ottenere vari stadi di maturazione, che permettono uno studio più accurato del ruolo di fenomeni come l'ipossia e la necrosi, presenti *in vivo*, ma assenti nei classici metodi di coltura in 2D. La crescita in sferoidi inoltre permette di ottenere il differenziamento delle cellule tumorali, che vanno così ad organizzarsi in strutture ben precise formando strutture prossime, per organizzazione, agli acini presenti nel colon *in vivo*. Dati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica effettuata sugli sferoidi nei diversi stadi di maturazione hanno evidenziato una notevole influenza dell'ipossia su geni importanti per la progressione tumorale, come BRAF, KRAS e



p53. Abbiamo inoltre riscontrato un'elevata espressione di geni pro-angiogenici come VEGFA e VEGFB e MMPs, che possono favorire il rilascio di fattori angiogenici e la formazione di metastasi. Infine in condizioni ipossiche e necrotiche abbiamo osservato un incremento dei geni di staminalità, CD44, CD166, CD24 e CD133 e soprattutto Nanog e Oct4. Questo potrebbe indicare la presenza di cellule staminali tumorali all'interno delle linee cellulari, attualmente molto dibattuta in letteratura, ed evidenzerebbe dunque la necessità di studiare il comportamento di tali popolazioni in 3D in quanto maggiormente rispondenti alle condizioni *in vivo*.

I nostri risultati mettono in luce come l'istituzione di sistemi di coltura per una migliore integrazione tra le strutture in 3D, e maggiormente tra le cellule tumorali e la componente stromale, risulti fondamentale per uno studio più accurato della progressione tumorale, ma soprattutto per lo sviluppo e la validazione di nuovi farmaci antitumorali, che in questo modo possono esser testati anche su porzioni di tessuto che presentano ipossia e necrosi, andandone così a valutare la capacità di penetrazione in tutto il tessuto e la reale efficacia.

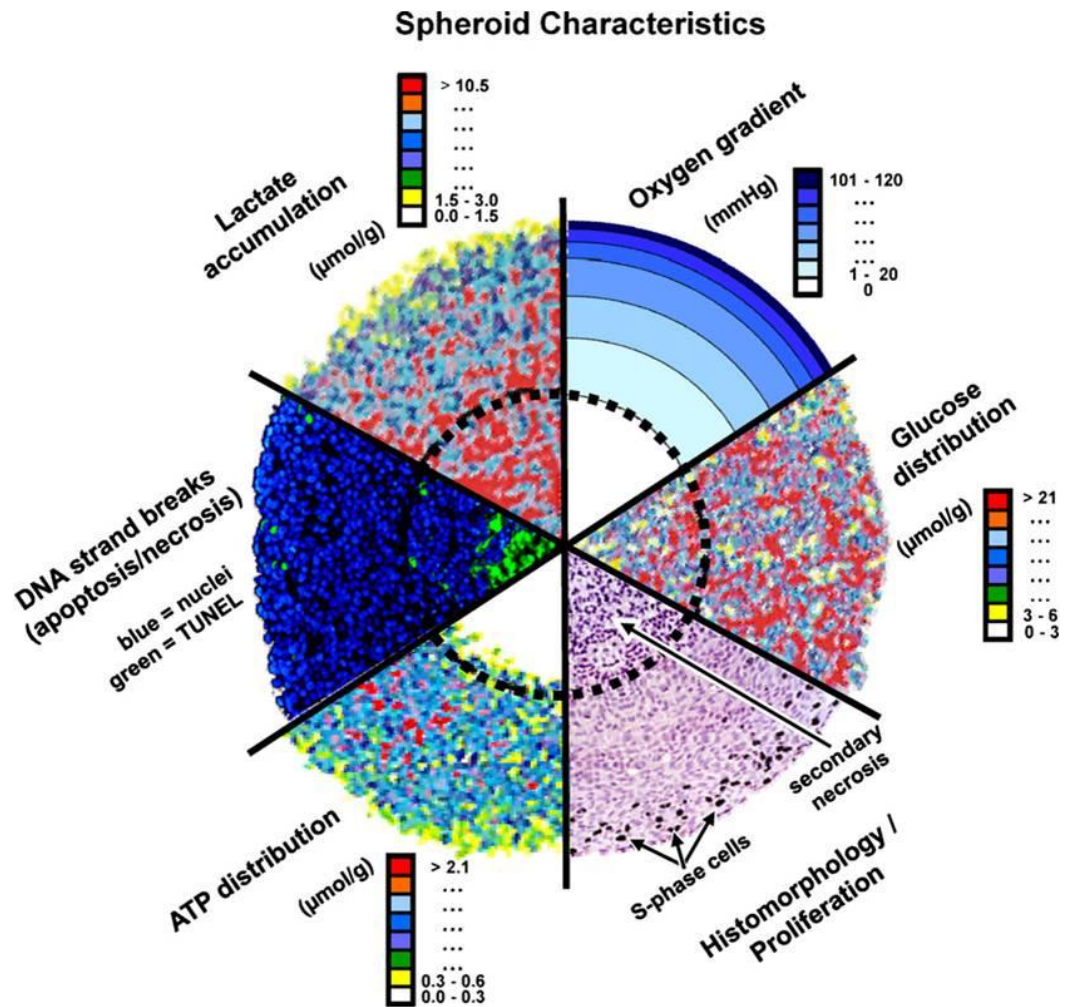
## ICONOGRAFIA



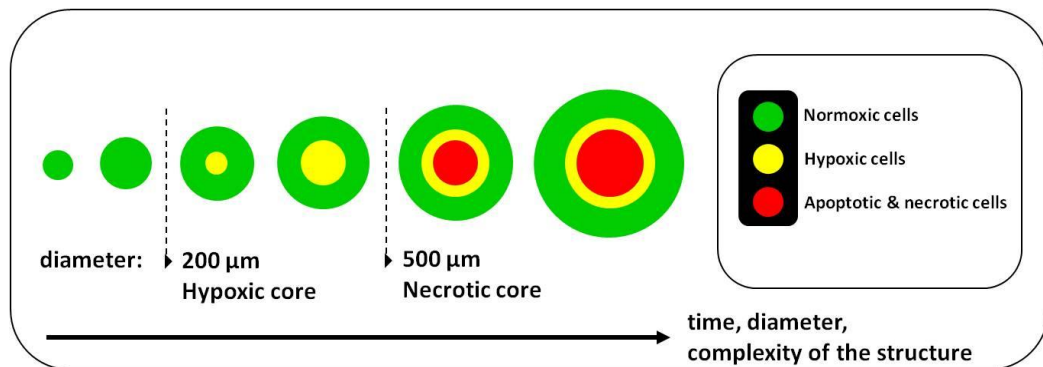
**Figura 1. Microambiente del tumore primario**

Le cellule tumorali nei tumori primari sono circondate da un complesso microambiente che comprende numerose tipologie di cellule, tra cui le cellule endoteliali della circolazione sanguigna e linfatica, i fibroblasti e una varietà di cellule derivate da midollo osseo (BMDCs), compresi i macrofagi, le cellule soppressori mieloidi-derivate (MDSCs), monociti (TEMs) e le cellule stromali mesenchimali (MSCs).

A



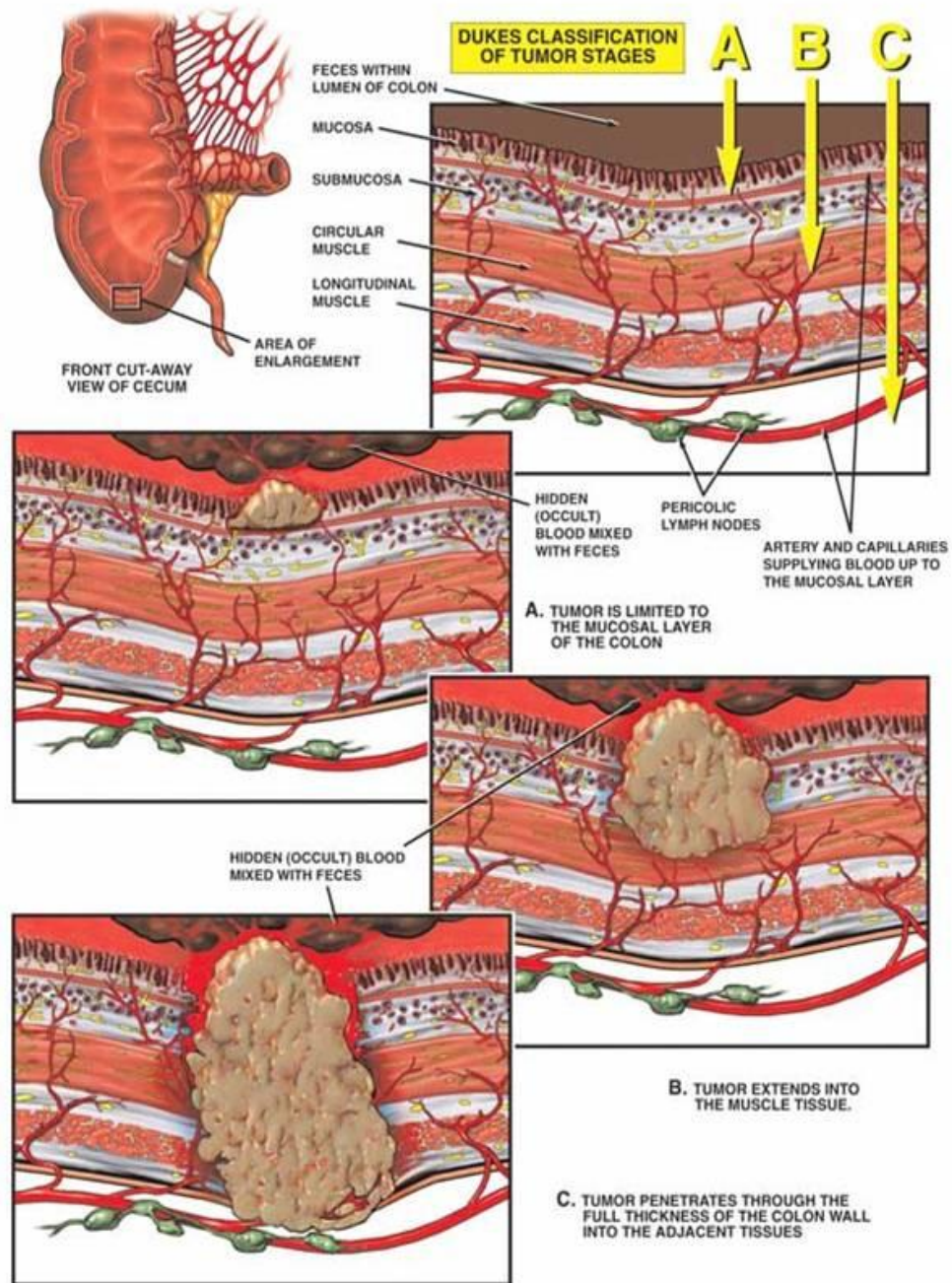
B



**Figura 2. Analisi della composizione strutturale e delle caratteristiche di uno sferoide.**

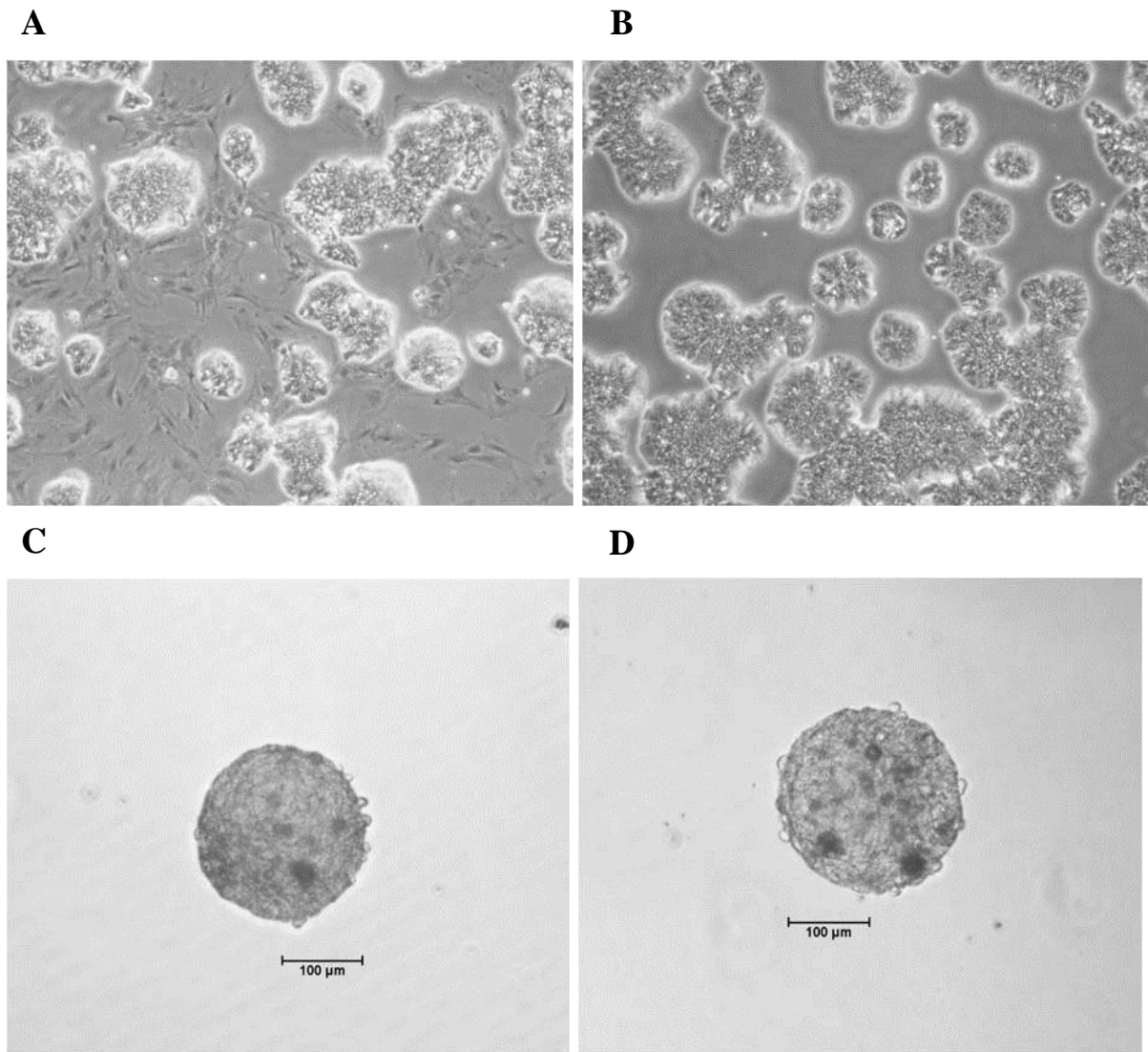
(A) All'interno dello sferoide avviene una distribuzione concentrica di nutrienti, ossigeno e sostanze necessarie alla crescita e proliferazione cellulare, a partire da elevati livelli negli strati più esterni e andando man mano a diminuire in quelli più interni. Studi basati sull'analisi dei livelli di glucosio, di lattato e di attività mitocondriale negli sferoidi indicano un adattamento del metabolismo cellulare allo stress ambientale nella regione interna dello sferoide, che mantiene l'omeostasi cellulare per un breve periodo fino al sopraggiungere della morte cellulare.

(B) Nello sferoide le cellule proliferanti si trovano principalmente nello strato periferico, le cellule degli strati più interni diventano, invece, man mano quiescenti e vanno incontro a morte cellulare, per apoptosi o necrosi, a causa della presenza di ipossia all'aumentare del diametro dello sferoide aumenta.



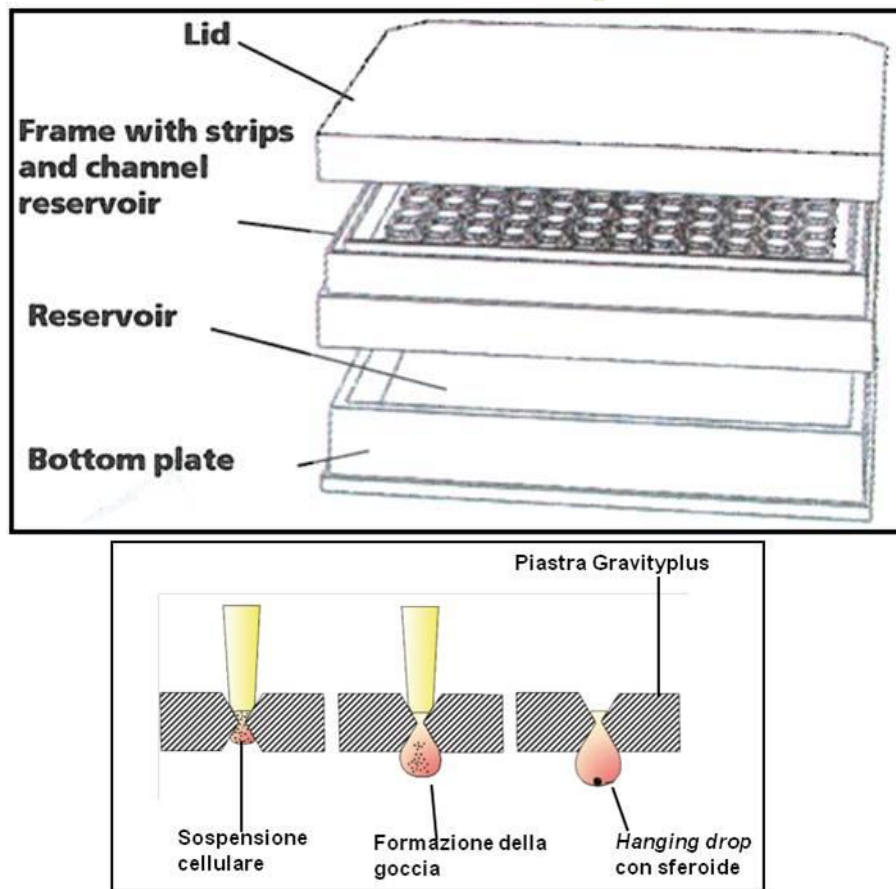
**Figura 3. Stadiazione di Dukes per il carcinoma coloretale.**

Nel primo stadio (A) il tumore è limitato alla mucosa del colon, nel secondo (B) si estende attraverso il tessuto muscolare e nel terzo (C) penetra attraverso l'intero spessore della parete del colon, invadendo i tessuti adiacenti.



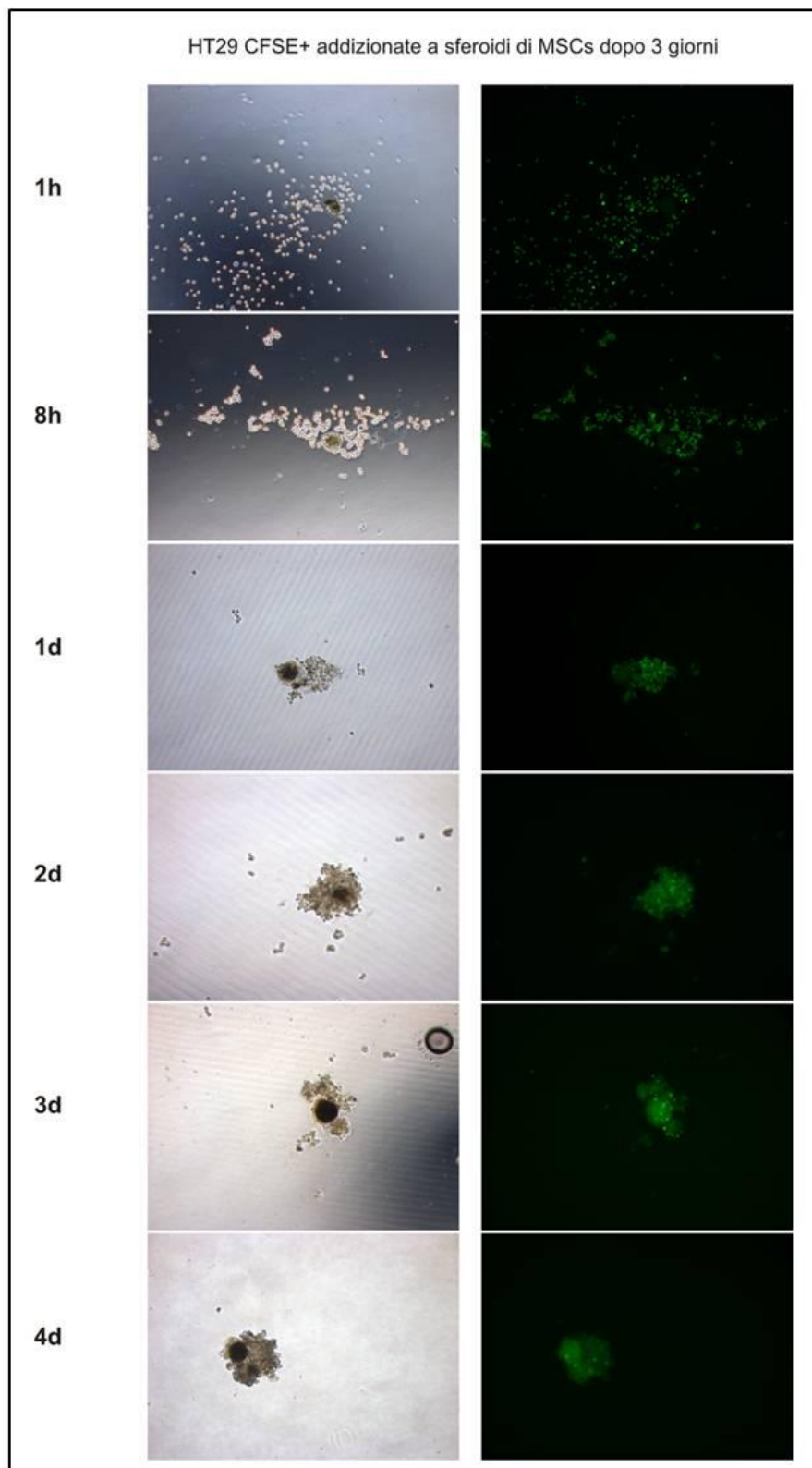
**Figura 4. Analisi della morfologia delle cellule in 2D rispetto al 3D.**

Le immagini sono rappresentative della coltura cellulare di HT29 in 2D in assenza (A) o in presenza (B) di MSCs e in 3D in assenza (C) e in presenza (D) di MSCs. Le immagini della coltura bidimensionale (A e B) di cellule HT29 con o senza MSCs sono state acquisite al quinto giorno di coltura. Le immagini della coltura tridimensionale (C e D) mostrano uno sferoide di HT29 da sole o con MSCs, generato con metodo "hanging drops" dopo sei giorni di coltura. (A e B, Ingrandimento 4X; C e D, Ingrandimento 10X)

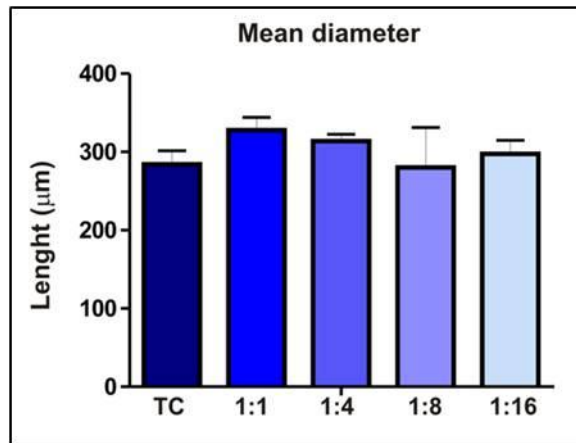
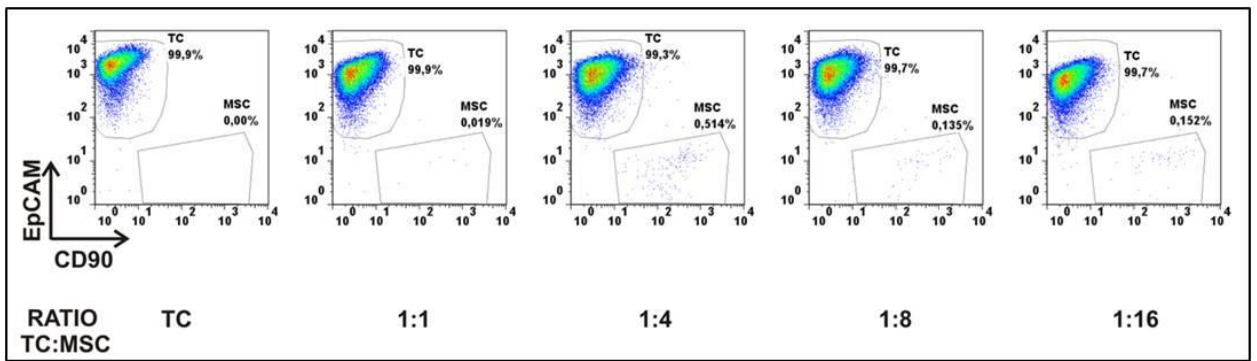


**Figura 5. InSphero GravityPlus™ System.**

Le piastre GravityPlus™ sviluppate dalla InSphero (InSphero AG, Zurich, Switzerland), permettono la formazione di sferoidi o micro-tessuti di dimensioni omogenee mediante la tecnologia “hanging drops”. Il sistema è stato ideato per consentire il regolare cambio del terreno di coltura e rappresenta quindi un metodo ottimale per le colture a lungo termine.



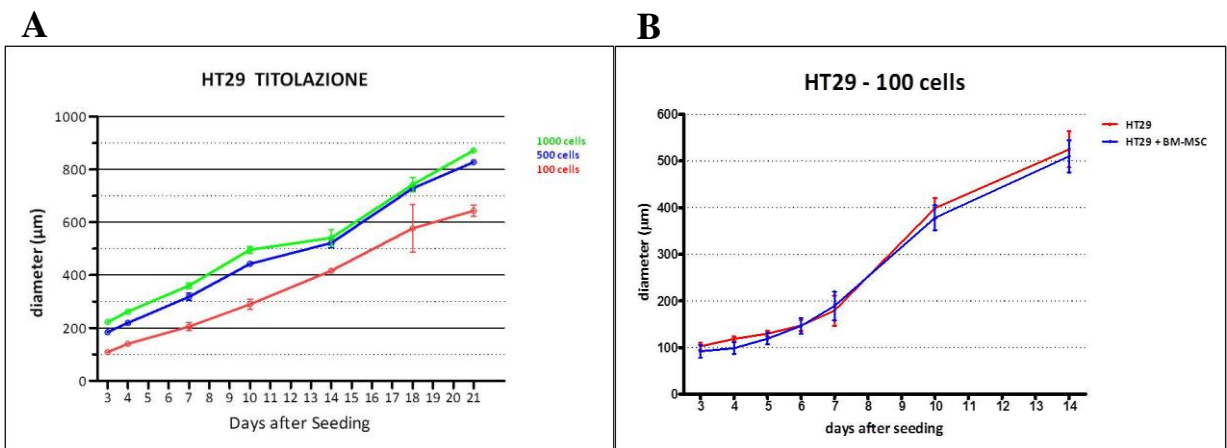
**Figura 6. Analisi della formazione dello sferoide mediante colorazione con CFSE.** Tale colorazione, effettuata sulle cellule tumorali, permette di distinguere le cellule tumorali dalle MSCs. E' stato possibile seguire a vari timepoints l'aggregazione delle cellule su un pre-esistente sferoide di MSCs e successiva formazione di un unico sferoide fino al quarto giorno di coltura.



**Figura 7. Selezione del rapporto ottimale cellule tumorali/MSCs**

La percentuale di cellule tumorali e MSCs dopo quattro giorni di co-coltura in 3D è stata analizzata mediante citofluorimetria, utilizzando come marcatori EpCAM e CD90.

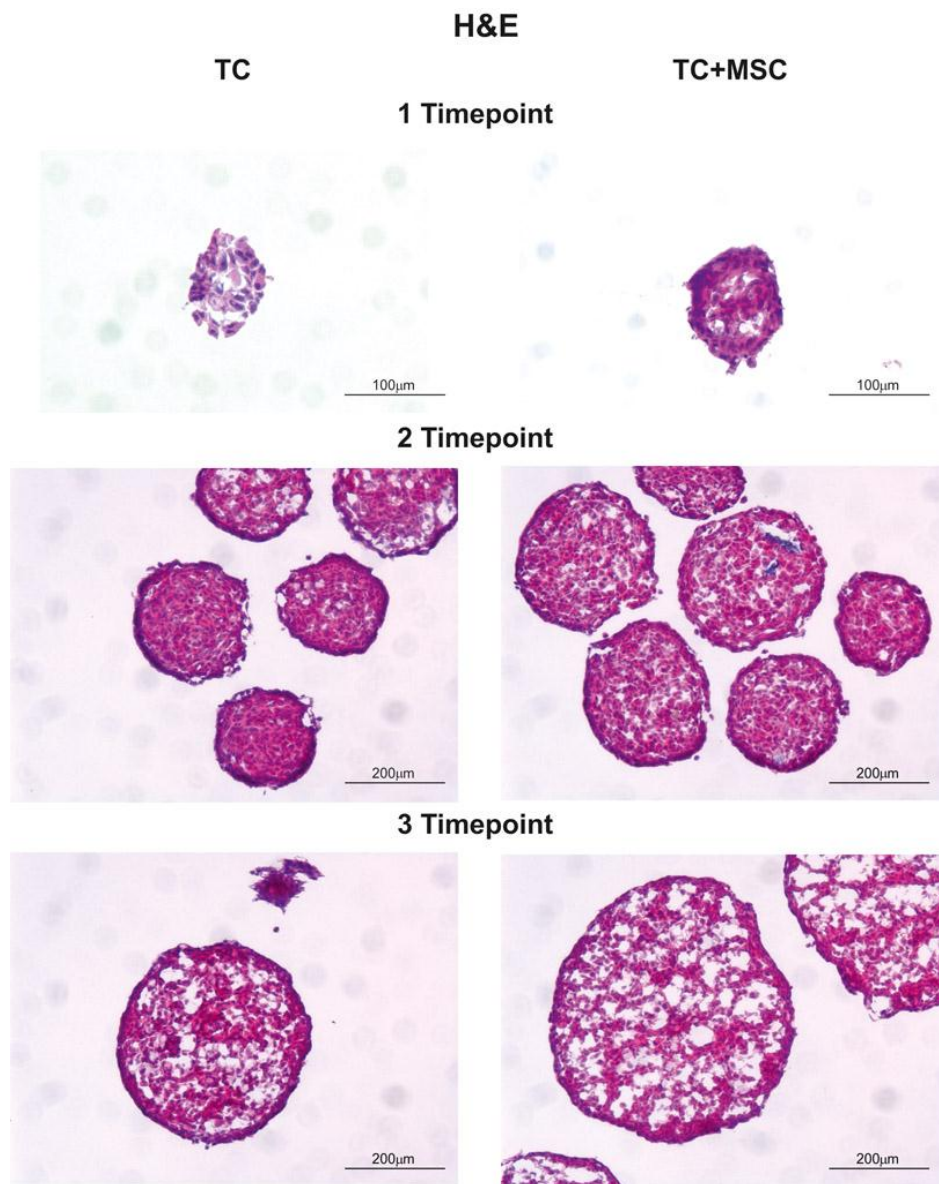
Il rapporto ottimale tra MSCs e cellule tumorali è risultato quello 1:4, in quanto alla fine della co-coltura è stato possibile trovare una percentuale più alta di MSCs rispetto agli altri rapporti cellulari testati e i diametri degli sferoidi misurati dopo quattro giorni presentavano una minore variabilità.



**Figura 8. Cinetica di crescita degli sferoidi HT29.**

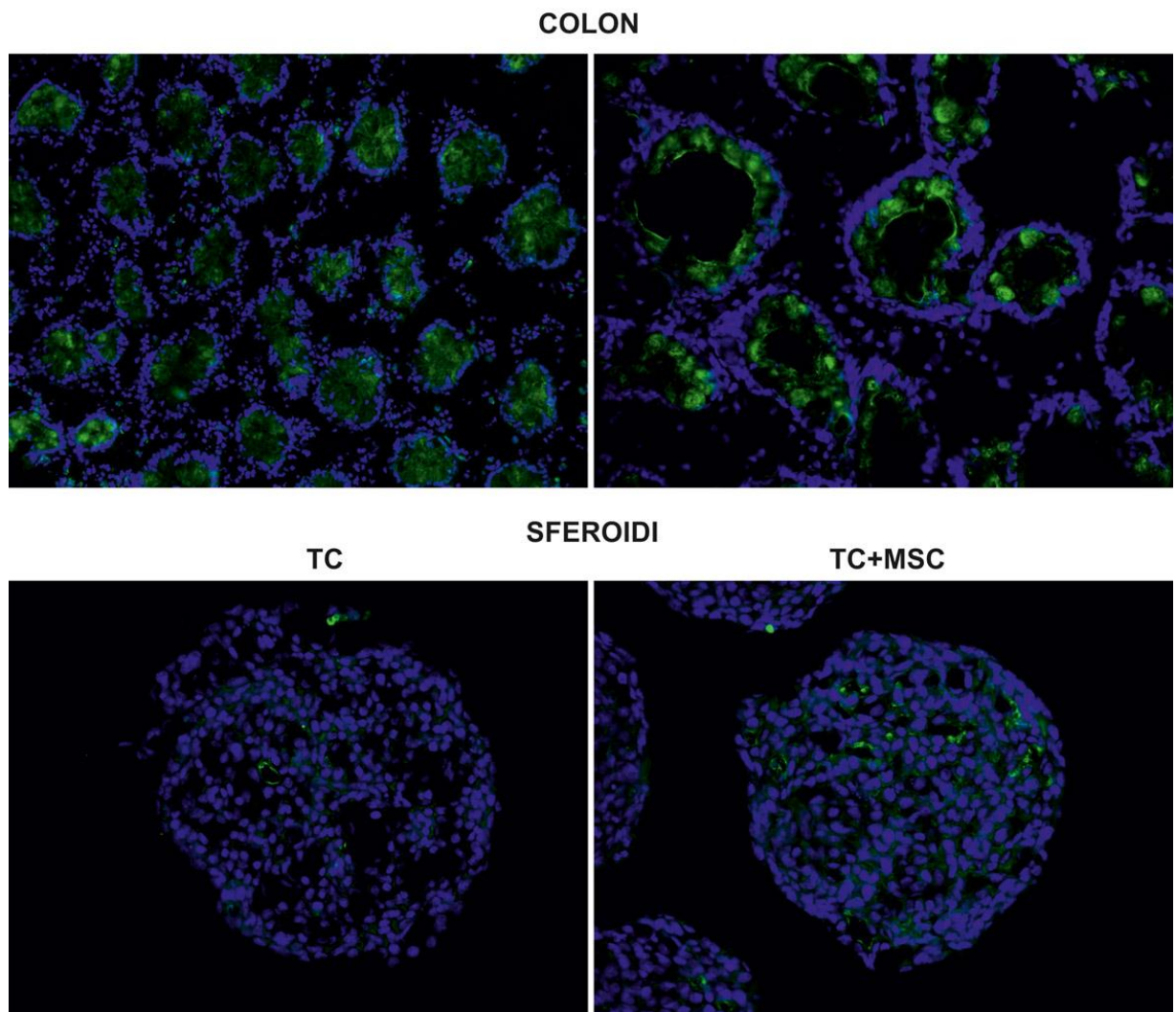
È stata effettuata una titolazione con tre concentrazioni di cellule di partenza: 100, 500 e 1000 cellule per pozzetto (A). La concentrazione iniziale di 100 cellule è risultata sufficiente per avere dopo 4 giorni di coltura un diametro  $\leq 200\mu\text{m}$  e per raggiungere dopo 14 giorni di coltura un diametro  $>500\mu\text{m}$ , sia per la monocoltura che per la co-coltura con MSCs (B).



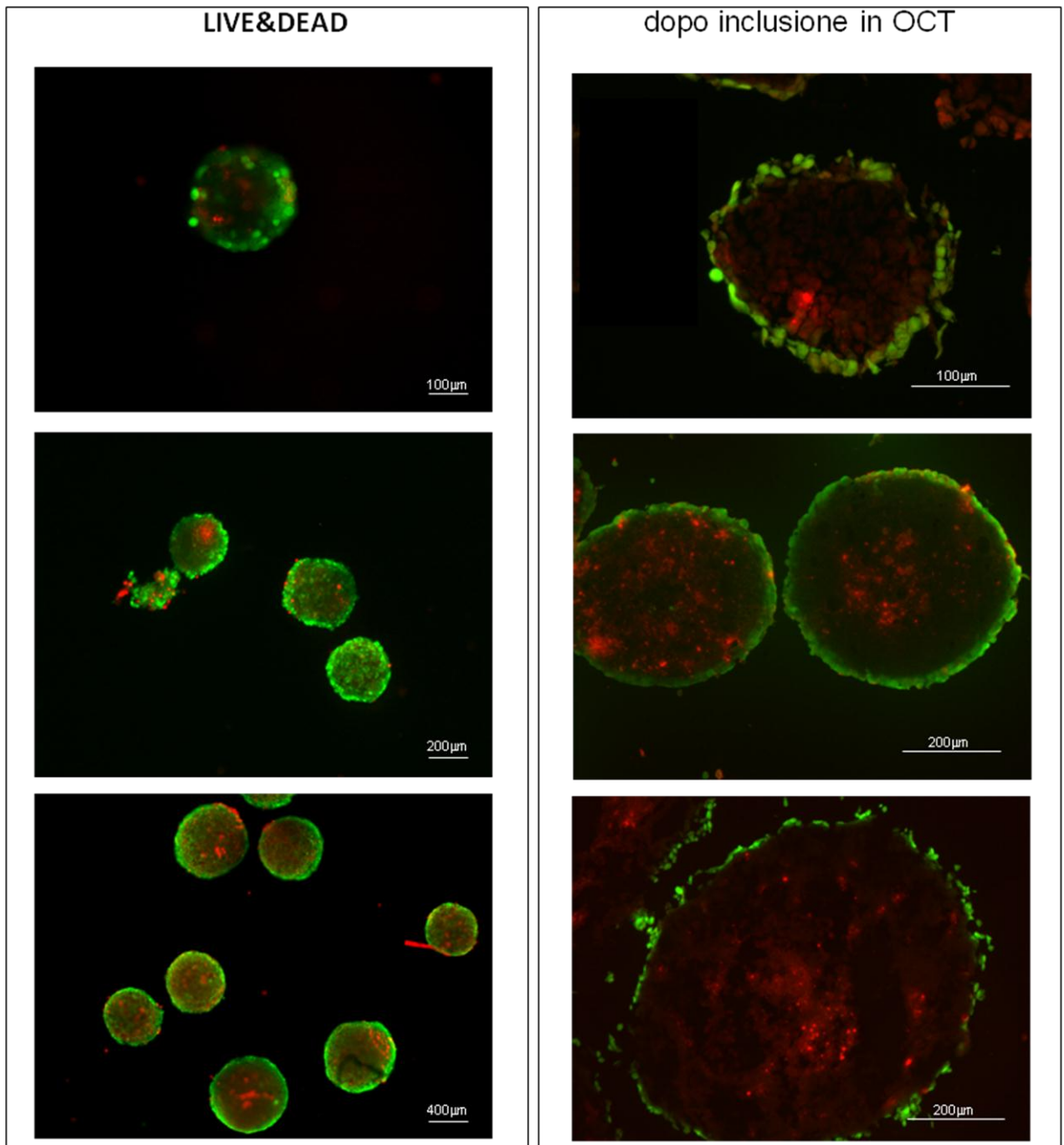


**Figura 9. Colorazione con ematossilina-eosina.**

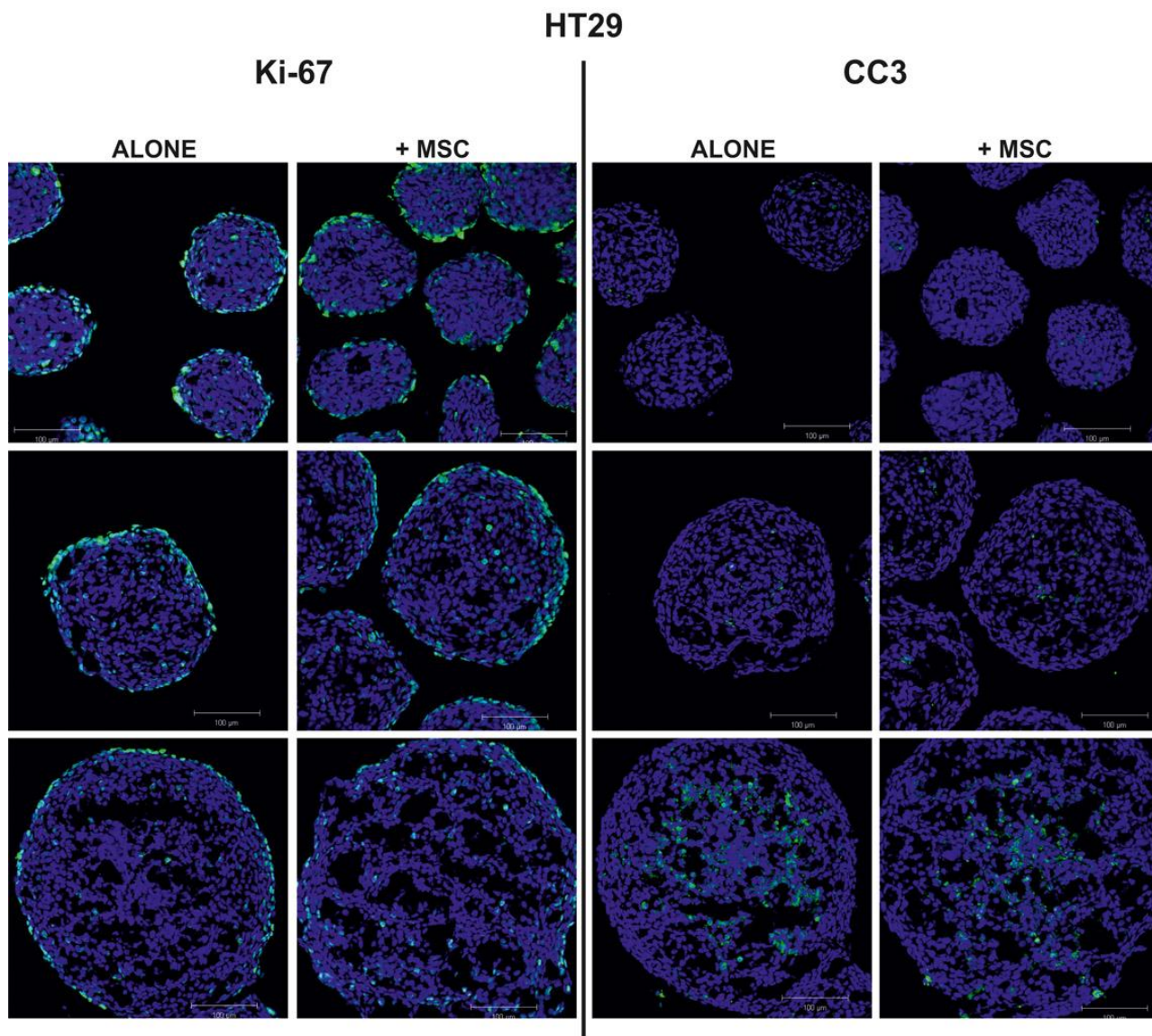
*Immagini rappresentative della colorazione in ematossilina ed eosina effettuata sugli sferoidi di HT29 in monocoltura (a sinistra) e in co-coltura con le MSCs (a destra).*



**Figura 10. Analisi della polarizzazione cellulare mediante colorazione per EBP50.**  
 Immagini rappresentative della colorazione in immunofluorescenza per la proteina EBP50. Nel pannello in alto è mostrata la distribuzione della proteina in criosezioni di colon umano (Ingrandimento 10x sulla sinistra e 20x sulla destra). Nel pannello in basso la distribuzione della proteina nelle cavità presenti in sferoidi HT29 in assenza e in presenza di MSCs (Ingrandimento 20x). In verde l'espressione dell'EBP50, in blu il DAPI.

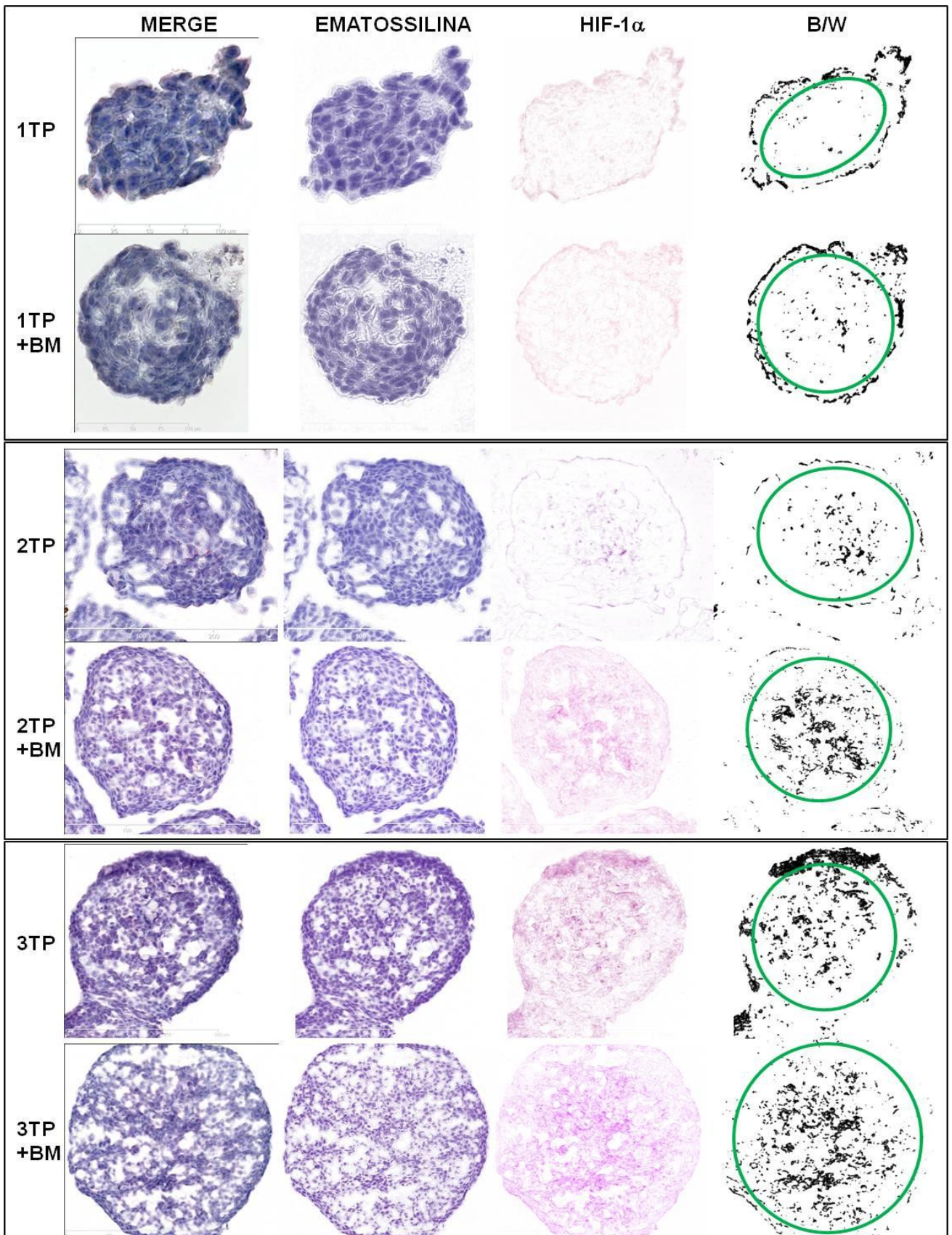


**Figura 11. Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD®.**  
*Analisi mediante immunofluorescenza della vitalità/citotossicità cellulare, sugli sferoidi appena raccolti (a fresco) e a seguito di fissazione ed inclusione in OCT.*



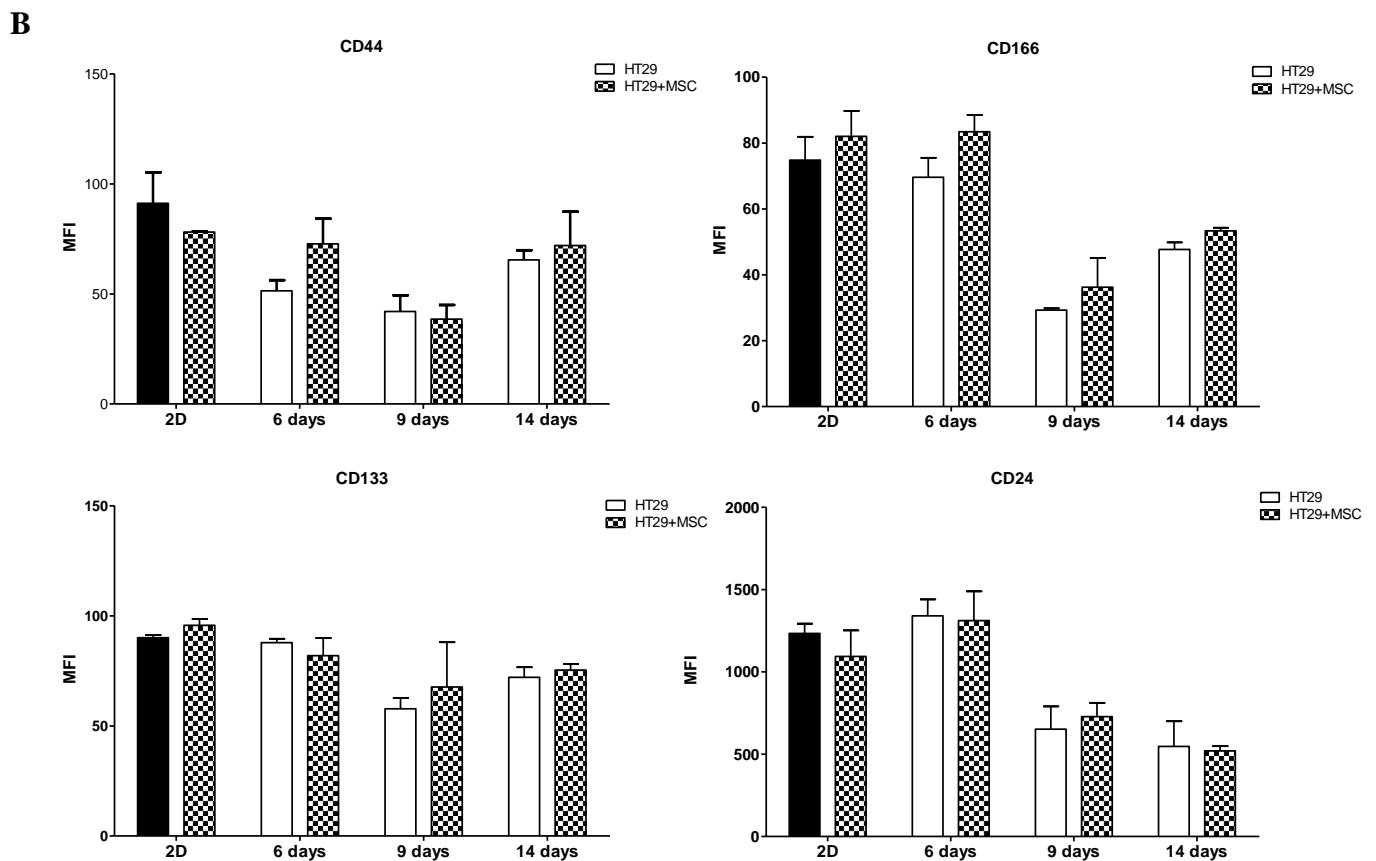
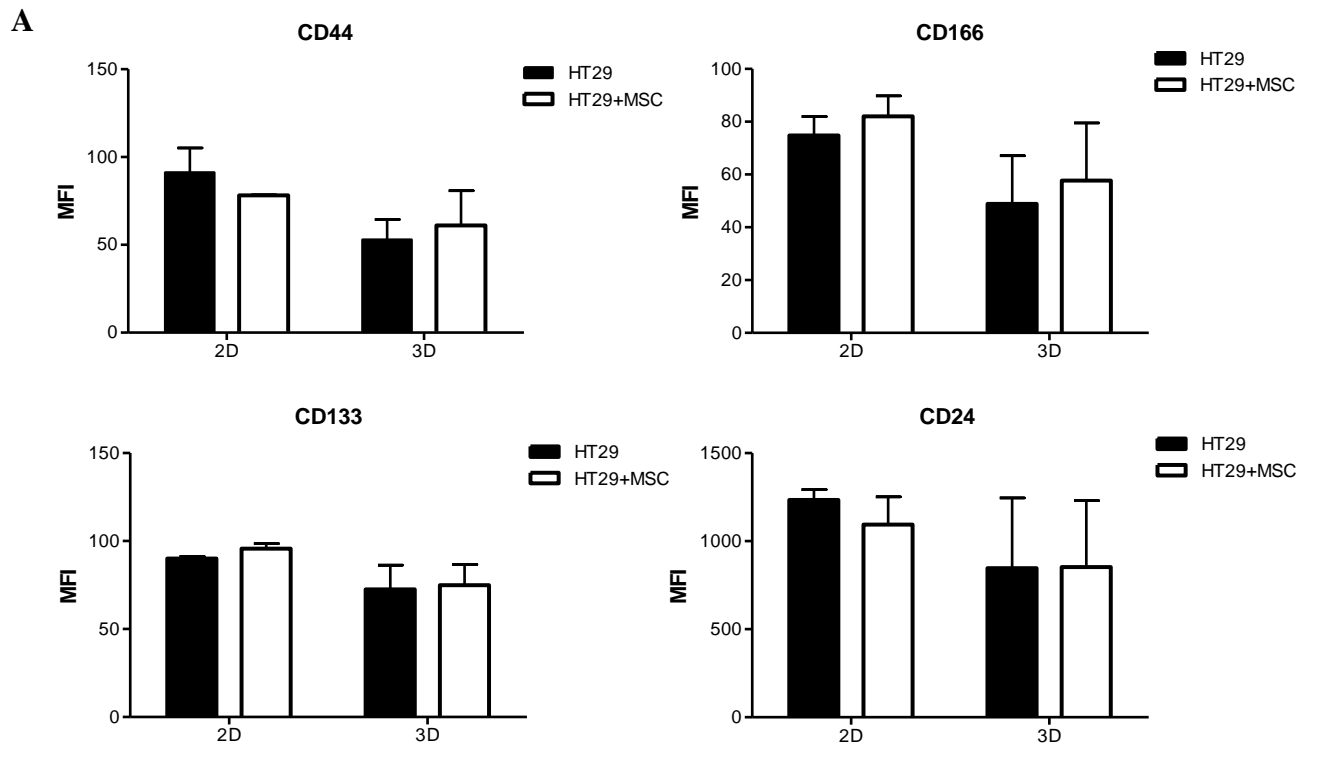
**Figura 12. Analisi della proliferazione cellulare e necrosi/apoptosi.**

Immagini rappresentative delle colorazioni in immunofluorescenza per le proteine Ki-67 (pannello a sinistra) e Caspasi 3 Clivata (CC3) (pannello a destra), effettuate su sferoidi di HT29 in monocoltura o in presenza di MSCs, nei tre diversi timepoints. Nel pannello a sinistra in verde le cellule proliferanti (Ki-67<sup>+</sup>), nel pannello a destra in verde le cellule necrotiche/apoptotiche (CC3<sup>+</sup>), in blu il DAPI. Le immagini sono state acquisite ad un ingrandimento 10X.



**Figura 13. Analisi, mediante immunoistochimica, di HIF1 $\alpha$ .**

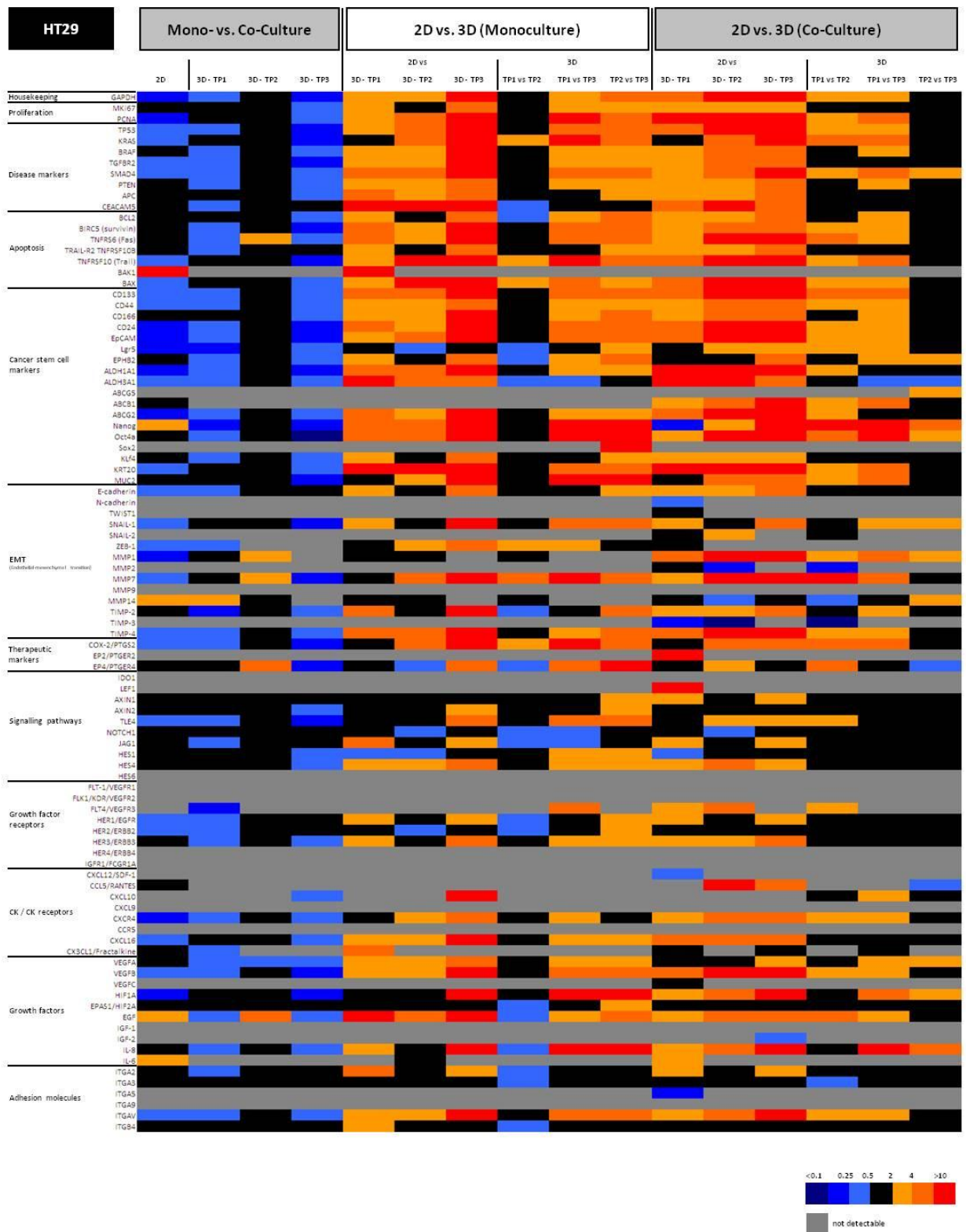
Immagini rappresentative delle colorazioni in immunoistochimica per l'HIF1 $\alpha$  su sferoidi di HT29 in assenza o in presenza di MSCs nei tre diversi timepoints. Nel pannello è mostrata la colorazione complessiva (MERGE), la deconvoluzione effettuata mediante un'analisi computazionale utilizzando un algoritmo (EMATOSSILINA e HIF1 $\alpha$ ) e la trasformazione in immagini binarie (B/W).



**Figura 14. Analisi dei marcatori di superficie mediante citofluorimetria.**

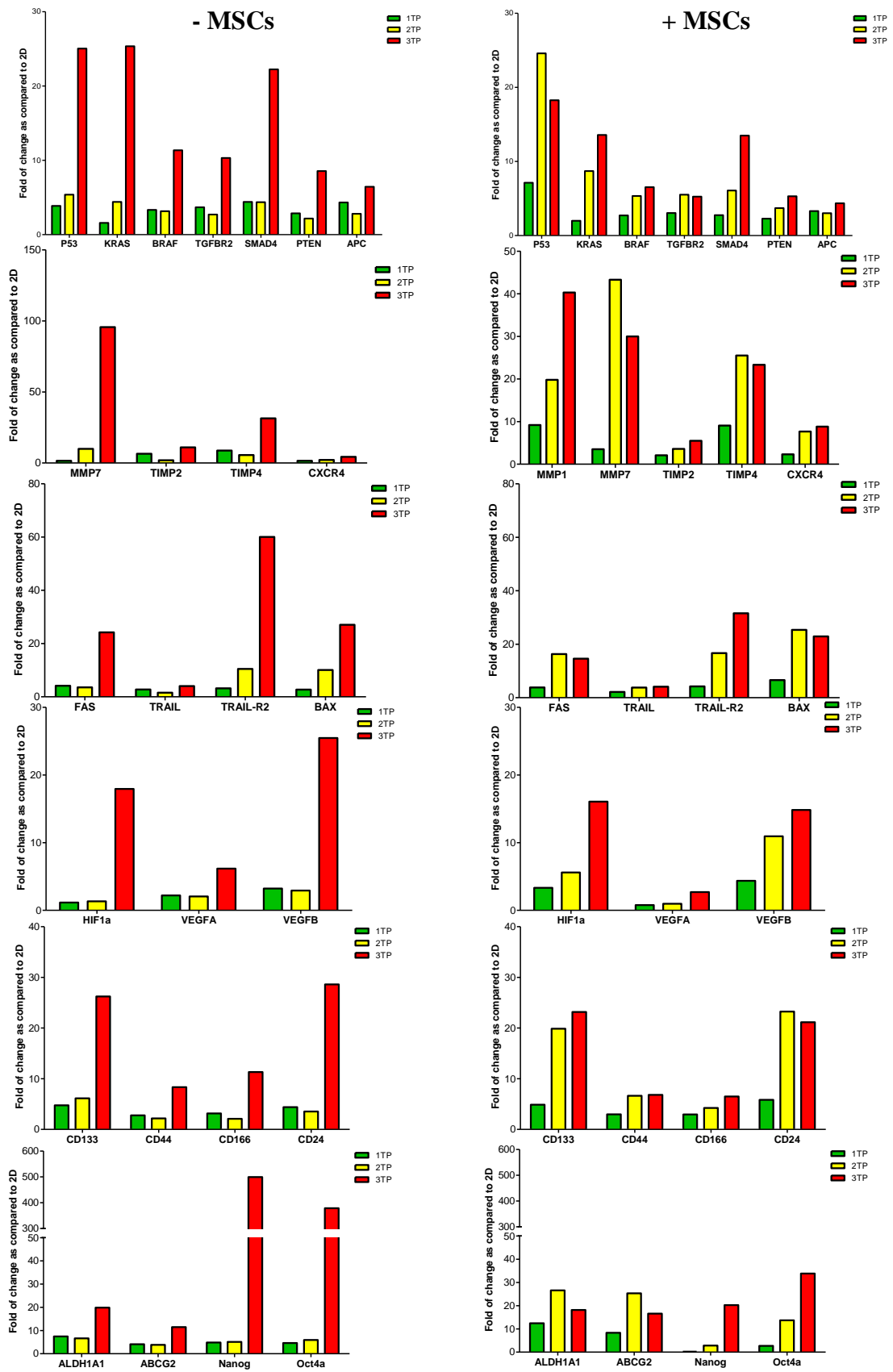
Analisi dell'espressione di CD44, CD166, CD133 e CD24 sulle cellule HT29 coltivate in 2D e in 3D, mediante analisi citofluorimetrica (MFI mean fluorescence intensity).

(A) Analisi della coltura in 2D rispetto alla media dei tre stadi di maturazione in 3D in assenza o in presenza di MSCs. (B) Analisi della coltura in 2D rispetto ai tre stadi di maturazione in 3D, in assenza o in presenza di MSCs.



**Figura 15. Analisi dell'espressione genica mediante heat map.**

L'espressione genica è stata analizzata utilizzando piastre Taqman Low density Array a 384 pozzetti. Sulle righe sono riportati i 96 geni analizzati, mentre sulle colonne sono riportati i diversi campioni. Ogni cella è colorata in base al livello di espressione di un gene in un campione, rispetto al controllo. Le intensità visualizzate rappresentano le differenze tra i valori di espressione dei geni in ogni coppia di campioni analizzata. Livelli di espressione maggiori rispetto al controllo sono colorati in rosso e quelli minori in blu, l'assenza di variazioni in nero. La scala indica il numero di volte che un dato gene è espresso al di sopra o al di sotto del controllo.



**Figura 16. Analisi dell'espressione genica**

Grafici rappresentativi delle più significative alterazioni dell'espressione genica di cellule HT29 coltivate in 3D rispetto al 2D in assenza ed in presenza di MSCs. L'analisi dell'espressione dei singoli geni è stata normalizzata sulla base dell'RNA 18s usato come housekeeping gene. I risultati sono stati normalizzati sulla base dei valori dell'espressione genica delle HT29 coltivate in 2D, per l'analisi in 3D in presenza di MSCs sulla base di quelli della co-coltura di HT29 e MSCs in 2D.



## BIBLIOGRAFIA

1. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007;130:601-610.
2. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:839-845.
3. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2005;15:365-377.
4. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1977;37:3639-3643.
5. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173-180.
6. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240:177-184.
7. Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Exp Cell Res* 2001;266:74-86.
8. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;449:557-563.
9. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1970;18:491-495.
10. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 2006;11:922-932.
11. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010;148:3-15.
12. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol* 2007;83:849-871.
13. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO<sub>2</sub> measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer* 1987;56:325-327.
14. Bredel-Geissler A, Karbach U, Walenta S, Vollrath L, Mueller-Klieser W. Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture. *J Cell Physiol* 1992;153:44-52.

15. Mellor HR, Ferguson DJ, Callaghan R. A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer* 2005;93:302-309.
16. Holbeck SL. Update on NCI in vitro drug screen utilities. *Eur J Cancer* 2004;40:785-793.
17. Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:217-221.
18. Hardelauf H, Frimat JP, Stewart JD, Schormann W, Chiang YY, Lampen P, Franzke J, Hengstler JG, Cadenas C, Kunz-Schughart LA, West J. Microarrays for the scalable production of metabolically relevant tumour spheroids: a tool for modulating chemosensitivity traits. *Lab Chip* 2011;11:419-428.
19. Burdett E, Kasper FK, Mikos AG, Ludwig JA. Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:351-359.
20. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009;4:309-324.
21. Timmins NE, Harding FJ, Smart C, Brown MA, Nielsen LK. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 2005;320:207-210.
22. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862-869.
23. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007;103:389-398.
24. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4353-4364.
25. Hendriks J, Riesle J, van Blitterswijk CA. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:170-178.
26. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375-379.
27. Mbeunkui F, Johann DJ, Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63:571-582.
28. Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130:1091-1103.
29. Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penfornis P, Tilghman SL, Salvo VA, Fonseca JP, Lacey MR, Beckman BS, McLachlan JA, Rowan BG, Pochampally R, Burow ME. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:293-300.
30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

31. La R, V, Schwarzenberger P, Miller A, Agrawal K, Kolls J, Weiner R. Marrow stem cells, mesenchymal progenitor cells, and stromal progeny. *Cancer Invest* 2002;20:110-123.
32. Stagg J. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev* 2008;4:119-124.
33. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2003;34:565-571.
34. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137:491-502.
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
36. Harrison. *Principi di medicina interna*. New York-Milano: McGraw-Hill, 2006.
37. De Vita, Hellmann, Lawrence. *Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
38. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA, Buring JE, Colditz GA, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Harnack L, Hartman AM, Jacobs DR, Jr., Kato I, Krogh V, Leitzmann MF, McCullough ML, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Schatzkin A, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Smith-Warner SA. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* 2005;294:2849-2857.
39. Gregory L, Brotzman. *Colorectal cancer Risk Factors*. Colorectal Cancer 2006.
40. Hamilton S.R. Colorectal Carcinoma in patients with Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1985.
41. Bocelli-Tyndall C, Zajac P, Di MN, Trella E, Benvenuto F, Iezzi G, Scherberich A, Barbero A, Schaeren S, Pistoia V, Spagnoli G, Vukcevic M, Martin I, Tyndall A. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2010;62:3815-3825.
42. Herrmann R, Fayad W, Schwarz S, Berndtsson M, Linder S. Screening for compounds that induce apoptosis of cancer cells grown as multicellular spheroids. *J Biomol Screen* 2008;13:1-8.
43. Chambers KF, Pearson JF, Aziz N, O'Toole P, Garrod D, Lang SH. Stroma regulates increased epithelial lateral cell adhesion in 3D culture: a role for actin/cadherin dynamics. *PLoS One* 2011;6:e18796.
44. Morales FC, Takahashi Y, Kreimann EL, Georgescu MM. Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17705-17710.
45. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 2007;23:241-256.

46. Fouassier L, Rosenberg P, Mergey M, Saubamea B, Claperon A, Kinnman N, Chignard N, Jacobsson-Ekman G, Strandvik B, Rey C, Barbu V, Hultcrantz R, Housset C. Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein (EBP50), an estrogen-inducible scaffold protein, contributes to biliary epithelial cell proliferation. *Am J Pathol* 2009;174:869-880.
47. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Amatruda N, Amicarella F, Viehl CT, Frey DM, Oertly D, Zuber M, Adamina M, Rosso R, Bocelli-Tyndall C, Martin I, Terracciano L, Spagnoli GC, Iezzi G. Tumor-associated stromal cells increase malignancy of human colorectal cancers through epithelial-to-mesenchymal transition. *Gastroenterology*, 2011.
48. Harrison LR, Micha D, Brandenburg M, Simpson KL, Morrow CJ, Denny O, Hodgkinson C, Yunus Z, Dempsey C, Roberts D, Blackhall F, Makin G, Dive C. Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1. *J Clin Invest* 2011;121:1075-1087.
49. Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 2003;179:801-811.
50. Muraro MG MVDSHJHMSG, Iezzi G. CD133, CD166/CD44 or CD24/CD44 markers fail to reliably identify cell populations with cancer stem cell functional features in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Research*, 2011.
51. van Staveren WC, Solis DY, Hebrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:92-103.
52. Liu T, Laurell C, Selivanova G, Lundeberg J, Nilsson P, Wiman KG. Hypoxia induces p53-dependent transactivation and Fas/CD95-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 2007;14:411-421.
53. Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7021-7026.
54. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3722-3727.
55. Yeung TM, Gandhi SC, Bodmer WF. Hypoxia and lineage specification of cell line-derived colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4382-4387.
56. Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;53:4754-4756.
57. Wong K, Rubenthiran U, Jothy S. Motility of colon cancer cells: modulation by CD44 isoform expression. *Exp Mol Pathol* 2003;75:124-130.
58. Harada N, Mizoi T, Kinouchi M, Hoshi K, Ishii S, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S. Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2001;91:67-75.

59. Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002;81:313-321.
60. Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 2004;57:1160-1164.
61. Mezzanzanica D, Fabbi M, Bagnoli M, Staurenngo S, Losa M, Balladore E, Alberti P, Lusa L, Ditto A, Ferrini S, Pierotti MA, Barbareschi M, Pilotti S, Canevari S. Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:1726-1733.
62. Rosso O, Piazza T, Bongarzone I, Rossello A, Mezzanzanica D, Canevari S, Orengo AM, Puppo A, Ferrini S, Fabbi M. The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2007;5:1246-1253.
63. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St CR, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and C. *J Clin Invest* 2008;118:2111-2120.
64. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946-10951.
65. Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005;319:15-26.